

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Grupo de Disciplinas de Ecologia e Hidrosfera

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-
DICLOROFENOXIACÉTICO, UM HERBICIDA SELECTIVO AMPLAMENTE
UTILIZADO NA AGRICULTURA, POR UMA ESTIRPE DE *PENICILLIUM*.**

SUMAYA FERREIRA GUEDES

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para
obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e
Segurança Alimentar.

Orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Leitão.

Monte da Caparica
2010

*"Sinto-me nascido a cada momento para
a eterna novidade do mundo"*

Fernando Pessoa.

Á minha família que sempre me apoiou,
particularmente a minha Mãe que é meu
espelho de coragem e fé. Te amo.

AGRADECIMENTOS

“Te agradecerei, Senhor, de todo o meu coração”

Salmo 138, 1ª.

Particularmente, por estar aqui e agora, para poder agradecer:

À minha orientadora Doutora Ana Lúcia Leitão pela paciência, apoio, ensinamentos e infinitos encorajamentos para manter-me firme e acreditar na vitória. Pela confiança apostada em mim e por ter acreditado no meu potencial. Muito mais que uma orientadora e professora, um exemplo verdadeiro de Mestre.

À professora Doutora Benildes Mendes por ter criado as condições necessárias que permitiram a realização do mestrado, tendo concedido uma bolsa de investigação pelo período de um ano para a realização do presente trabalho.

Ao GDEH pelo auxílio financeiro concedido para que eu pudesse vir a concluir este trabalho.

Aos professores dos quais tive a honra de ser aluna durante o mestrado e que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos João, Joana e Maria pelo carinho demonstrado durante este tempo de convívio.

À Claudia pela amizade, carinho, apoio, atenção e pela ajuda em diversos assuntos.

À Marlene e ao Chiodini pela amizade e pelas ajudas durante a realização do mestrado e deste trabalho.

Ao João Carlos pelo carinho, amor, amizade, companheirismo e apoio em todos os momentos, incluindo os de desespero e dificuldades. Por ter me aturado por tanto tempo.

À Suyane e ao Giorgio, muito mais que irmãos, meus verdadeiros amigos. Pessoas que eu amo demais.

Ao meu pai pelo apoio e palavras de conforto e esperança.

À minha Mãe, pessoa a qual devo tudo que sou. Meu exemplo de mulher e de guerreira. O seu apoio, amor, coragem, fé e esperança que me tornaram quem sou hoje.

A todos que de alguma forma me ajudaram e acreditaram em mim, o meu
MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

O uso extensivo de pesticidas na agricultura tem gerado intensas pesquisas a fim de proteger a contaminação dos recursos hídricos e do solo.

Os Herbicidas apresentam estruturas químicas semelhantes aos compostos biodegradáveis, apesar de serem mais complexos. Entre os inúmeros herbicidas existentes, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um ingrediente activo em várias formulações e tem sido amplamente aplicado para controlar plantas daninhas dicotiledóneas em culturas de cana-de-açúcar e cereais.

Recentemente, foi isolada uma estirpe de *Penicillium* de uma mina de sal no sul de Portugal, tendo sido identificada como *Penicillium chrysogenum* CLONA2. Estudos mostraram que esta estirpe de *Penicillium* é capaz de degradar compostos fenólicos sem a formação de metabólitos tóxicos. Conhecendo a capacidade de biodegradação de compostos tóxicos pelo *P. chrysogenum*, métodos químicos e microbiológicos foram aplicados a fim de investigar o efeito do 2,4-D no crescimento do fungo em meio sólido e, portanto, as condições capazes de potenciar a biodegradação do herbicida em cultura submersa.

Os ensaios realizados mostraram que o *Penicillium* foi capaz de crescer em meio sólido em concentrações de até 1000 mg/L de 2,4-D. Em cultura submersa, o microrganismo apresentou capacidade de biodegradar 21% do 2,4-D em meio mínimo mineral com pH 7,00 e com a adição do α -cetoglutarato como co-substrato. Ensaio de CBO₅ e os dados da biomassa corroboram com a hipótese de que o *P. chrysogenum* é capaz de degradar o 2,4-D.

O *Penicillium* pode desempenhar um papel ecológico importante na degradação do 2,4-D, com uma capacidade de biodegradação considerada elevada em comparação com as outras estirpes fúngicas descritas.

Palavras chaves: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, biodegradação, *Penicillium*, herbicida.

ABSTRACT

The extensive use of pesticides in agriculture has generated intense research in order to protect the contamination of water resources and soil. The herbicides have chemical structures similar to biodegradable compounds, although they are more complex. Among the numerous existing herbicides, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is an active ingredient in several formulations and has been widely applied to control weeds in dicotyledonous crops of sugar cane and cereals.

Recently, a strain of *Penicillium* has been isolated from a salt mine in southern Portugal, and further identified as *Penicillium chrysogenum* CLONA2. Studies showed that this strain of *Penicillium* is able to degrade phenolic compounds without the formation of toxic metabolites. Knowing the ability for biodegradation of toxic compounds by *P. chrysogenum*, chemical and microbiological methods were applied in order to investigate the effect of 2,4-D on the growth of fungal strain on solid medium, and therefore the conditions able to enhance the biodegradation of the herbicide in submerged culture.

The tests showed that *Penicillium* was able to grow on solid medium at concentrations up to 1000 mg/L of 2,4-D. In submerged culture, the microorganism showed ability to degrade 21% of 2,4-D in mineral minimum medium at pH 7.00 with the addition of α -ketoglutarate as co-substrate. Tests of BOD₅ and biomass data supported the hypothesis that *P. chrysogenum* was able to degrade the 2,4-D.

The *Penicillium* can play an important ecological role in the degradation of 2,4-D, with a biodegradation efficiency considered high in comparison to other fungal strains studied.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, biodegradation, *Penicillium*, herbicide

SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2,4-DCP: 2,4-diclorofenol

NaCl: Cloreto de sódio

DEA: Di-etanolamina

DMA: Di-metilamina

IPA: Isopropilamina

TIPA: Tri-isopropanolamina

BEE: 2-butoxietil

EHE: 2- etilhexilo

IPE: Isopropil

P.F: Ponto de Fusão

P.E: Ponto de ebulição

LD50: Dose letal para 50% da população em estudo

LC50: Concentração letal para 50% da população em estudo

MRID: Registro Padrão dos estudos realizados pelo EPA

K_{oc} : Coeficiente de adsorção do solo

MC: Meio complexo

MMFE: Meio mínimo com ferro

CO₂: Dióxido de carbono

tfdA: Gene que codifica a enzima α -cetoglutarato dioxigenase

tfdB: Gene que codifica a enzima 2,4-diclorofenol hidroxilase

tfdC: Gene que codifica a enzima clorocatecol 1,2 dioxigenase

tfdD: Gene que codifica a enzima cloromuconato cicloisomerase

tfdE: Gene que codifica a enzima dienalactona hidrolase

tfdF: Gene que codifica a enzima maleilacetato redutase

KG: Dioxigenase cetoglutarato-dependente

Fe: Ferro

α -Keto: α -cetoglutarato

PGA: Fosfoglicerato

AcCoA: Acetil-coenzimaA

Glyox: Glioxilato

OAA: Oxalacetato

Succ: Succinato

CBO₅ : Carência Bioquímica de Oxigênio

Mn: Manganês

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

T_R: Tempo de retenção

UNIDADES

mg/L - miligrama por litro

mM - milimolar

t - tonelada

$\mu\text{g/L}$ - micrograma por litro

μL - microlitro

mg/kg - miligrama por kilograma

p/v - peso por volume

mL - mililitro

min - minuto

nm - nanómetro

rpm – rotações por minuto

mm/h- milímetro por hora

mm- milímetros

μM - micromolar

μm - micrómetro

mL/min- mililitro por minuto

ÍNDICE DE MATÉRIAS

Objectivo e organização do trabalho	1
1. Introdução	3
1.1. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).....	6
1.1.1. Histórico	6
1.1.2. Mecanismo de acção do ácido 2,4-diclorofenoxacético nas plantas dicotiledóneas	10
1.2. Toxicidade do ácido 2,4-diclorofenoxiacético	11
1.3. Impacto ambiental	15
1.4. Vias de biodegradação por microrganismos descritas para o ácido 2,4- diclorofenoxiacético	24
1.5. Metabolismo <i>versus</i> Cometabolismo	28
1.5.1. Influências dos co-substratos na degradação do 2,4-D	29
1.6. Fungos	30
1.6.1. Potencial de biorremediação de estirpes de <i>Penicillium</i>	32
1.6.2. <i>Penicillium chrysogenum</i> CLONA2	33
2. Material e métodos	35
2.1. Ensaio em meio sólido com diferentes concentrações salinas	35
2.2. Ensaio em meio sólido com diferentes fontes de carbono.	37
2.3. Ensaio em meio sólido com adição do 2,4-diclorofenol (2,4-DCP)	38
2.4. Taxa de crescimento apical.	39
2.5. Preparação do pré-inóculo	39
2.6. Meio de cultura líquido	41
2.7. Ensaio da Carência Bioquímica de Oxigénio.	42
2.7.1. Avaliação do efeito de uma e três lavagens na preparação do inóculo .	43
2.7.2. Influência da adição de diferentes co-substratos	45
2.8. Comparação da eficiência de degradação do herbicida pelo <i>Penicillium</i> face a diferentes concentrações salinas em cultura submersa	45
2.9. Fermentação em cultura submersa: efeito combinado de diferentes	

concentrações salinas com a adição conjunta do manganês, α -cetoglutarato e ácido ascórbico na degradação do herbicida	46
2.10. Fermentação em cultura submersa: efeito da adição de um açúcar como fonte de carbono suplementar na degradação do herbicida	46
2.11. Fermentação em cultura submersa: comparação da degradação do 2,4-D face a adição de diferentes co-substratos	47
2.12. Fermentação em cultura submersa: biodegradação do 2,4-D na presença de α -cetoglutarato em meios com diferentes pH: 5,70; 7,00 e pH tamponado a 6,5.	47
2.13. Determinação do pH	48
2.14. Estimativa da Biomassa	49
2.15. Determinação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).	49
2.15.1. Condições cromatográficas para análise	51
2.15.2. Recta de calibração	53
3. Apresentação e discussão dos resultados	55
3.1. Crescimento em meio sólido face a diferentes concentrações salinas	55
3.2. Crescimento em meio sólido face a adição de diferentes fontes de carbono..	58
3.2.1. Meio sólido sem suplementação de açúcar.	59
3.2.2. Meio sólido suplementado com 2% de glicose	61
3.2.3. Meio sólido suplementado com 2% de lactose	64
3.2.4. Meio sólido suplementado com 2% de sacarose	68
3.2.5. Comparação do crescimento do <i>Penicillium</i> em meio sólido entre as diferentes fontes de carbono utilizadas.	71
3.3. Crescimento em meio sólido face a adição do 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), um intermediário descrito na degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético	72
3.4. Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO ₅)	74
3.4.1. Influência de diferentes lavagens do micélio na Carência Bioquímica de Oxigénio	75
3.4.2. Influência da adição conjunta de diferentes co-substratos na CBO ₅	77
3.5. Morfologia do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2.	82
3.6. Análise da degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético em meio líquido	83
3.6.1. Biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético face a adição de	

uma fonte de açúcar suplementar: sacarose, lactose e glicose.	84
3.6.2. Degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético na presença de 0%, 2% e 5,9% de NaCl	86
3.6.3. Biodegradação do 2,4-D em diferentes concentrações salinas com adição conjunta de três co-substratos: manganês, α -cetogluturato e ácido ascórbico.	91
3.6.4. Influência dos diferentes co-substratos na degradação do 2,4-D.	95
3.6.5. Influência do pH na biodegradação do 2,4-D na presença de α -cetogluturato	97
3.7. Optimização da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético pelo <i>Penicillium crhysogenum</i> CLONA2.	100
4. Conclusão	105
4.1. Perspectivas para trabalhos futuros.....	107
Bibliografia	109
Anexos	133

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.1 - Painel A: Estrutura Química do ácido 2,4-diclorofenoxiacético; Painel B: Fórmula Molecular do 2,4-D.	07
Figura 1.2 - Distribuição mundial de pesticidas, segundo a sua aplicação.....	07
Figura 1.3 – Possíveis mobilizações do 2,4-D no ambiente.	16
Figura 1.4 - Vias de degradação 2,4-D no ambiente (I).	22
Figura 1.5 - Vias de degradação do 2,4-D no ambiente (II).	23
Figura 1.6 - Via descrita para a degradação do 2,4-D por <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134.	24
Figura 1.7 – Vias descritas para a degradação do 2,4-D por <i>Arthobacter</i> sp. (1) e <i>Pseudomonas</i> sp. (2).	25
Figura 1.8 - Reacção global do 2,4-D via dioxigenase α -cetoglutarato dependente.	26
Figura 1.9 - Via metabólica proposta para a regeneração do α -cetoglutarato e para a síntese de 3-fosfoglicerato (PGA) como um precursor da síntese de biomassa durante a conversão do 2,4-D.	27
Figura 1.10 - Morfologia das hifas encontradas em culturas submersas de fungos filamentosos e actinomicetas.	31

Figura 1.11 - Estrutura micro-morfológica de <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 ampliado 400 vezes.	34
---	----

CAPÍTULO II

Figura 2.1 - Câmara de fluxo laminar STERIL-VBH, com fluxo vertical constante.....	36
---	----

Figura 2.2 - Painel A: Autoclave Darlab-K400; Painel B: Estufa MEMMERT-GTR0214.	37
---	----

Figura 2.3 - Incubadora CERTOMAT, modelo Sartorius stedim BS-T, utilizada nos ensaios de cultura submersa.	40
--	----

Figura 2.4 - Painel A: Aparelho respirométrico Oxitop; Painel B: Cabine termostática, regulado para a temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$	42
---	----

Figura 2.5 - Esquema da preparação dos ensaios de CBO ₅ . Painel A: lavagens; Painel B: Inoculação.	44
--	----

Figura 2.6 - Eléctrodo de pH CRISON (Modelo MicropH2001).	48
---	----

Figura 2.7 - Painel A: Estufa MEMMERT; Painel B: Balança DENVER INSTRUMENT COMPANY (modelo TR-204).	49
---	----

Figura 2.8 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) MERCK HITACHI, Modelo Lachron.	51
--	----

Figura 2.9 - Recta de calibração para análise cromatográfica do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.	54
---	----

Figura 3.1 - Comparação das taxas de crescimento apical do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 entre diferentes condições salinas e diferentes concentrações de 2,4-D em meio CDA.	57
Figura 3.2 - Taxa de crescimento apical do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 entre diferentes concentrações de 2,4-D em meio czapeck sem outra fonte de carbono.	60
Figura 3.3 - Taxa de crescimento apical do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 entre diferentes concentrações de 2,4-D em meio czapeck, sem sacarose e suplementado com 2% de glicose.	62
Figura 3.4 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na morfologia do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 ao fim de 168 horas de incubação a 25 °C (I).	63
Figura 3.5 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na morfologia do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 ao fim de 168 horas de incubação a 25 °C (II).	64
Figura 3.6 - Taxa de crescimento apical do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 a diferentes concentrações de 2,4-D em meio czapeck (sem sacarose) suplementado com 2% de Lactose.	66
Figura 3.7 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D combinados com lactose na morfologia do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 no fim de 168 horas de incubação a 25°C.	67
Figura 3.8 - Taxa de crescimento apical do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 entre diferentes concentrações de 2,4-D em meio czapeck suplementado com 2% de sacarose.	69
Figura 3.9 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D combinado com sacarose na morfologia do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 ao fim de 168 horas de incubação a 25°C.	70

Figura 3.10 - Taxa de crescimento apical de todas as amostras em meio sólido com diferentes fontes de carbono.	71
Figura 3.11 - Taxa de crescimento apical do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 com diferentes concentrações de 2,4-diclorofenol em meio sólido com composição idêntica ao meio Czapeck, excepto a sacarose.	73
Figura 3.12 - Carência Bioquímica de Oxigénio com 3 lavagens.	77
Figura 3.13 - Carência Bioquímica de Oxigénio com adição de ácido ascórbico ao meio.	79
Figura 3.14 - Efeito da adição de manganês no ensaio respirométrico.	80
Figura 3.15 - Influência do α -cetoglutarato na Carência Bioquímica de Oxigénio.	81
Figura 3.16 - Comparação da percentagem da Carência Bioquímica de Oxigénio observada após 24 horas de inoculação a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com 40 mg/L de 2,4-D.	82
Figura 3.17 - Morfologia do <i>P. chrysogenum</i> CLONA2 após 72 horas de incubação a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 160 rpm.	83
Figura 3.18 - Degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético pelo <i>Penicillium</i> em meio mínimo suplementado com 2% de sacarose, 2% de lactose, 2% de glucose e sem adição de açúcar (controlo).	85
Figura 3.19 - Degradação do 2,4-D ao final de 72 horas, com diferentes concentrações salinas na presença de $1,18\text{ }\mu\text{M}$ de manganês.	87
Figura 3.20 - Comparação entre os valores das áreas obtida para o pico intermediário correspondente ao TR 2,48 minutos nas diferentes condições salinas.....	88

Figura 3.21 - Análise das áreas obtidas para dois tempos de retenção nas diferentes condições salinas.	89
Figura 3.22 – Cromatogramas obtidos nos ensaios com diferentes concentrações salinas após 72 horas de incubação.	90
Figura 3.23 - Degradação do 2,4-D ao fim de 72 horas, a partir de uma concentração inicial de 50 mg/L na presença de manganês, α -cetoglutarato e ácido ascórbico com diferentes concentrações salinas (0%, 2% e 5,9% de NaCl).	92
Figura 3.24 – Comparação das áreas obtidas para três tempo de retenção nas diferentes concentrações salinas.	93
Figura 3.25 - Cromatogramas referentes às diferentes concentrações salinas e adição dos substratos α -cetoglutarato, ácido ascórbico e manganês.	94
Figura 3.26 - Degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético após 24 horas na presença de diferentes co-substratos.	96
Figura 3.27 - Degradação do 2,4-D nas diferentes condições de pH ao fim de 48 horas.	99
Figura 3.28 - Efeito do pH na determinação da biomassa.	99
Figura 3.29 – Comparação da degradação do 2,4-D e do 2,4-DCP por diversas estirpes de fungos.	102

ÍNDICE DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1.1 - Consumo dos principais ingredientes activos de pesticidas, segundo as classes de uso no Brasil, em 2001.08

Quadro 1.2 - Características químicas do 2,4-D e derivados.08

Quadro 1.3 - Dados de toxicidade aguda do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e derivados.12

CAPÍTULO II

Quadro 2.1 - Condições cromatográficas utilizadas nas análises do 2,4-D.52

Quadro 2.2 - Partição da fase móvel utilizada nas análises do 2,4-D segundo o método cromatográfico gradiente.52

Quadro 2.3 - Dados obtidos na preparação da recta de calibração do 2,4-D...53

CAPÍTULO III

Quadro 3.1 - Média do crescimento apical do *Penicillium* em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) combinado com diferentes concentrações de 2.4 D.56

Quadro 3.2 - Média do crescimento apical do <i>Penicillium</i> em meio sólido na presença do 2,4-D como única fonte de carbono.	59
Quadro 3.3 - Média do crescimento apical do <i>Penicillium</i> em meio sólido na presença de 2,4-D com 2% de glicose.	61
Quadro 3.4 - Média do crescimento apical do <i>Penicillium</i> em meio sólido suplementado com 2% de lactose.	65
Quadro 3.5 – Média do crescimento apical do <i>P. chrysogenum</i> em meio sólido na presença de 2,4-D e sacarose como fontes de carbono.	68
Quadro 3.6 - Média da CBO ₅ com 1 e 3 lavagens do micélio.	76
Quadro 3.7 - Média da Carência Bioquímica de Oxigénio durante cinco dias utilizando diferentes substrados.	78

OBJECTIVO E ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

As práticas agrícolas estão directamente relacionadas com o uso de herbicidas, a fim de controlar as pragas que atacam os produtos cultivados na agricultura e desta forma, aumentar a produtividade dos géneros alimentícios. Em contrapartida, a contaminação ambiental por estes pesticidas oriundos das práticas agrícolas se tornou um problema de grande importância mundial devido aos diferentes níveis de persistência no ambiente, além da toxicidade exercida sobre os organismos contaminados.

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida organoclorado utilizado em diversos países. Apesar da existência de estudos sobre a biodegradação deste herbicida por algumas estirpes de fungos, apenas alguns apresentaram capacidade de degradar o 2,4-D em percentagens superiores a 10%, existindo poucos estudos sobre a biodegradação do herbicida pelo *Penicillium chrysogenum*.

Atendendo ao exposto e conhecendo a capacidade de biodegradação de compostos tóxicos como o fenol e metabolitos organoclorados, além da característica halotolerante do *Penicillium chrysogenum* CLONA2, o trabalho teve como objectivo central verificar a capacidade de biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) pelo *Penicillium* em culturas submersas.

De acordo com os resultados obtidos, este trabalho visou igualmente a optimização do processo de degradação do xenobiótico pelo *P. chrysogenum*, recorrendo a métodos químicos e microbiológicos nos ensaios em meio sólido e em meio líquido.

A dissertação está estruturada em duas fases. Na primeira fase é apresentada uma revisão bibliográfica sobre o tema a ser estudado e na segunda fase é abordada a parte laboratorial realizada para a conclusão do presente trabalho. Para facilitar a leitura e entendimento, a dissertação foi dividida em quatro capítulos:

✓ Capítulo I: Aborda a revisão bibliográfica sobre o ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Inclui ainda uma abordagem sobre os fungos e sobre a estirpe de *Penicillium*, organismo estudado na biodegradação do 2,4-D.

✓ Capítulo II: É composto pelos métodos químicos e bioquímicos, incluindo os protocolos utilizados para verificar a capacidade de degradação do 2,4-D pelo fungo.

✓ Capítulo III: Apresenta e discute os resultados obtidos nos ensaios de biodegradação do 2,4-D.

✓ Capítulo IV: Corresponde às conclusões obtidas sobre a biodegradação do 2,4-D pelo *P. chrysogenum* CLONA2 e apresenta as sugestões para a realização de trabalhos futuros.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a necessidade de se aumentar a produção dos géneros alimentícios incentivou de maneira decisiva o aprimoramento das tecnologias de produção, permitindo avanços que, compatibilizando a demanda de produção, podem ser considerados essenciais para o desenvolvimento de um país (Tauchert, 2006).

Após a segunda guerra mundial, aumentou o número de pesquisas relacionadas com o desenvolvimento de novas tecnologias, permitindo otimizar e incrementar as técnicas de produção, possibilitando assim, um aumento substancial do abastecimento agrícola (Tauchert, 2006).

Geralmente, o crescimento da produtividade está associado aos avanços da mecanização e ao desenvolvimento de culturas com ciclo de produção mais curtos, ao emprego de fertilizantes, adubos químicos e ao emprego de substâncias que auxiliam no controlo de pragas (Tauchert, 2006).

Desde então, os pesticidas têm assumido uma importância cada vez maior na manutenção dos sistemas de produção agropecuários (Castro, 1989). Os pesticidas abrangem um grupo heterogéneo de substâncias químicas cujo objectivo é controlar uma variedade de pragas, sendo geralmente classificados como inseticidas, herbicidas e similares, de acordo com o tipo de praga para a qual revelaram acção eficaz (Miligi *et al.*, 2006).

O uso dos herbicidas tem aumentado nos países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento durante as últimas décadas. Dentro do mercado mundial dos pesticidas, os herbicidas merecem destaque, representando 47% do total, seguido de 25% dos inseticidas e 28% de similares (Short, 2005).

Uma das consequências do uso de pesticidas é o aumento da poluição ambiental gerada devido às descargas de fábricas, escoamento superficial, lixiviação, derrames acidentais e outras fontes de contaminação. Águas, hortaliças, frutas, cereais, produtos de origem animal, como carne, leite e peixe foram descritos anteriormente como estando contaminados com pesticidas (Guedes *et al.*, 2009). Por conseguinte, a adequação das técnicas, a aplicação e a complexidade estrutural/funcional do pesticida no meio ambiente, principal receptor dos processos de distúrbios ocasionados pelos mesmos, merecem atenção imediata por parte da comunidade científica para regulamentação destes produtos (Castro, 1989).

No contexto ambiental, os herbicidas organoclorados despertam especial preocupação, principalmente em função da sua persistência e dos inúmeros efeitos tóxicos sobre os organismos contaminados. Os herbicidas, embora com uma estrutura química mais complexa, são semelhantes aos compostos naturais que são biodegradáveis. Porém, é necessário o controlo e a protecção das culturas devido à elevada resistência dos herbicidas frente a processos convencionais de tratamento, o que faz com que o desenvolvimento de novos sistemas de biorremediação sejam de extrema importância (Guedes *et al.*, 2009).

Entre os inúmeros herbicidas existentes, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um ingrediente activo em várias formulações e tem sido amplamente aplicado para controlar plantas daninhas dicotiledóneas em culturas de cana-de-açúcar e cereais, como milho, trigo, aveia, cevada e centeio (Donnelly *et al.*, 1993).

Birmingham e Colman (1985), detectaram resíduos na ordem de 1 mg/L de 2,4-D, sob condições de frio, em lagoas artificiais, tendo sido observado acumulações, verificando-se que a degradação deste químico é dependente do oxigénio dissolvido e da temperatura da água.

Actualmente, existe uma grande preocupação que passa por proteger os recursos hídricos e o solo de contaminações e também recuperar os locais já contaminados. Neste área, a biorremediação constitui uma das soluções mais prometedoras e de crescente interesse. A complexidade da estrutura química do

2,4-D é um dos problemas que mais dificulta a sua degradação em corpos de água (Guedes *et al.*, 2009).

Técnicas de adsorção, especialmente com carvão activado, foram os primeiros métodos apontados como promissores na remoção de 2,4-D. No entanto, o custo associado a este tratamento invalida a sua aplicação, particularmente nos países em desenvolvimento (Adams e Watson, 1996; Aly e Faust, 1965).

Métodos químicos, como ozonólise seguida de tratamento de dióxido de titânio foi proposto como um método muito eficaz para a redução de 70% dos 100 mg/L de 2,4-D (Nakamura *et al.*, 2008). Contudo, o processo natural, da atenuação através da acção bacteriana é o método mais utilizado. Entre eles, *Arthrobacter sp.* (Tiedje *et al.*, 1969), *Xanthobacter sp.* (Ditzelmuller *et al.*, 1989), *Alcaligenes paradoxus* e *Alcaligenes eutrophus* (Don e Pemberton, 1981), *Pseudomonas cepacia* (Daugherty e Karel, 1994), *Acinetobacter sp.* (Silva *et al.*, 2007), *Serratia marcescens* (Silva *et al.*, 2007), *Bradyrhizobium sp.* (Kitagawa *et al.* 2002), *Stenotrophomonas stenotrophomonas* (Silva *et al.*, 2007; Smejkal *et al.*, 2003) e *Flavobacterium sp.* (Chaudhry e Huang, 1988; Silva *et al.*, 2007).

Na verdade, como os herbicidas halogenados não são poluentes pouco comuns na natureza, os microrganismos evoluíram no sentido da produção de uma extensa gama de enzimas, além de várias vias e mecanismos de controlo envolvidos na degradação de xenobióticos. Apesar da informação existente sobre a bioquímica e genética relacionada com a biodegradação do 2,4-D em bactérias (culturas puras ou mistas), os estudos sobre o uso de fungos são limitados, especialmente no que diz respeito às vias catabólicas.

Donnelly *et al.*, (1993) estudaram a capacidade de nove fungos micorrízicos (*Oidiodendron griseum*, *Hymenoscyphus ericae* 1318, *Gautieria crisper* 4936, *Gautieria othii* 6362, *Radiigera atroleba* 9470, *Rhizopogon vinicolor* 7534, *Phanaerochaete chrysosporium* 1767, *Pacificus sclerogaster* 9011, e *Trappea darkeri* 8077) de degradar e mineralizar o ácido 2,4-diclorofenoxiacético como substrato, nas concentrações de 1mM e 4 mM. Após 8 semanas de incubação em saís minerais contendo extracto de levedura e glicose, nenhuma das culturas

apresentou capacidade de crescer em concentrações de 4 mM de 2,4-D. No entanto, todos os fungos cresceram em culturas suplementadas com 1 mM do herbicida. O *P. chrysosporium* 1767 foi o fungo que mais eficientemente degradou o 2,4-D, sendo esta degradação em função da concentração de tartarato de amónio adicionado ao meio como fonte de azoto.

A biodegradação de herbicidas na água e nos solos é governada por diversos factores bióticos e abióticos. Os microrganismos, na sua versatilidade e interações, as condições ambientais (temperatura, pH, oxigénio e nutrientes) e os constituintes do solo, são exemplos de factores que afectam a degradação do 2,4-D.

Uma estirpe de *Penicillium* foi isolada de um solo tropical no Brasil, tendo sido descrita como capaz de degradar o 2,4-D (Silva *et al.*, 2007). Esta estirpe foi capaz de reduzir 29,80% do ácido 2,4-diclorofenoxiacético a partir de uma concentração inicial de 100 mg/L em meio complexo (Silva *et al.*, 2007).

Recentemente, foi isolada uma estirpe de *Penicillium* de uma mina de sal no sul de Portugal, tendo sido identificada como *Penicillium chrysogenum* CLONA2 com base em características morfológicas e bioquímicas. Estudos mostraram que esta estirpe de *Penicillium* é capaz de degradar compostos fenólicos em meio mínimo mineral com 58,5 g/L de cloreto de sódio (NaCl) sem a formação de metabólitos tóxicos (Leitão *et al.*, 2007).

1.1. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

1.1.1. Histórico

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi desenvolvido durante a segunda guerra mundial (1939-1945) por uma equipe britânica, com o objectivo de aumentar a produção agrícola durante a guerra devido à sua acção eficaz contra ervas daninhas (Leitenberg, 2001).

A sua estrutura complexa (Figura 1.1) em conjunto com o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) permitiu a produção do agente laranja utilizado durante a Guerra do Vietnã ocorrida entre 1954-1975 (Frumkin, 2003). Foi também utilizado na operação conhecida como “Rabch hand” (1962-1971) que causou a desfolhagem nas florestas vietnamitas, onde foram aplicados aproximadamente 68.000m³ de 2,4-D por aviões e helicópteros americanos nas áreas rurais (Frumkin, 2003).

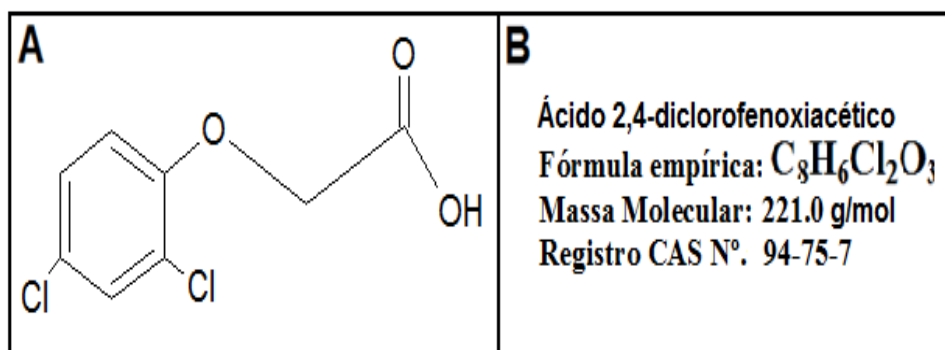


Figura 1.1 – Painel A: Estrutura Química do ácido 2,4-diclorofenoxiacético; Painel B: Fórmula Molecular do 2,4-D.

Fonte: Adaptado EPA, 2005.

Quando foi comercialmente lançado, em 1946, o 2,4-D tornou-se o primeiro herbicida selectivo bem sucedido, permitindo o controlo de ervas daninhas de folhas largas em plantações como milho, arroz e cereais (Leitenberg, 2001).

Segundo Short (2005), os pesticidas mais produzidos são orientados ao controlo de ervas daninhas (herbicidas), sendo responsáveis por cerca de 47 % da produção mundial (Figura 1.2).

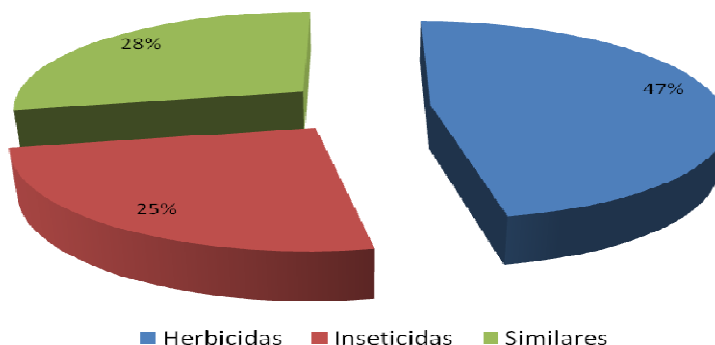


Figura 1.2 - Distribuição mundial de pesticidas, segundo a sua aplicação.

Fonte: Adaptado de Short, 2005.

No Brasil, os pesticidas mais amplamente aplicados são os herbicidas (Quadro 1.1), englobando mais de 50% do total (Junior, 2007). O ácido 2,4-diclorofenoxiacético, incluindo sais e ésteres (vide anexo I), é o segundo herbicida mais utilizado, com a utilização de aproximadamente 9 mil toneladas em 2001 e o seu destino no ambiente é de grande importância na preservação de solos e de água potável (Waite *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2005).

Quadro 1.1 - Consumo dos principais ingredientes activos de pesticidas, segundo as classes de uso no Brasil, em 2001.

Classes de uso	Ingrediente activos	Consumo (t)	Participação em relação ao total da classe de uso (%)
Herbicidas	Ácido 2,4-D	9492,4	10,33
	Glifosfato	44467,0	48,38
Inseticidas	Clorpirifós	2215,8	10,30
	Endosulfan	4058,0	18,86
	Metamidofós	4290,4	19,93
Similares	Mancozebe	3097,4	17,39
	Oxicloreto de cobre	4644,3	26,08

Fonte: Adaptado de Junior, 2007.

Actualmente, o 2,4-D encontra-se em mais de 600 produtos e há mais de 100 limites de tolerância listados no Code of Federal Regulations, tendo sido registado e inscrito no documento de orientação padrão no ano de 1988 (EPA, 2005). Os dados disponíveis sobre as características químicas do ácido 2,4-D, sais e ésteres, estão resumidos no Quadro 1.2.

Quadro 1.2 - Características químicas do 2,4-D e derivados

Ingrediente activo	Cor	Estado físico	Ponto de Fusão (PF)/ Ponto de Ebulição (PE)	Solubilidade
Ácido 2,4-D	Branco	Sólido cristalino	P.F. 138-141 °C	Água= 569 mg/L a 20 °C
Sal 2,4-D Na	Branco	Pó	P.F. 200 °C	Água = 4.5 g/100 mL a 25 °C

Ingrediente activo	Cor	Estado físico	Ponto de Fusão (PF) / Ponto de Ebulição (PE)	Solubilidade
Sal 2,4-D DMA ²	Âmbar	Líquido aquoso	P.F. 118-120 °C	g/100 mL a 20 °C Água= 72.9 (pH 7)
Sal 2,4-D IPA ³	Âmbar	Líquido aquoso	P.F. 121 °C	g/100 mL a 20 °C Água = 17.4 (pH 5.3)
Sal 2,4-D TIPA ⁴	Âmbar	Líquido aquoso	P.F. 87-110 °C	g/100 mL a 20 °C. Água= 46.1 (pH 7)
2,4-D BEE ⁵	Âmbar escuro	Líquido	P.E. 89 °C	g/100 mL a 20 °C
2,4-D 2-EHE ⁶	Âmbar escuro	Líquido	P.E. 300 °C	Água= Insolúvel Água = 86.7 µg/L
2,4-D IPE ⁷	Âmbar pálido	Líquido	P.E. 240 °C	Água = 0.023 g/100 mL

*Sal 2,4-D di-etanolamina¹; Sal 2,4-D di-metilamina²; Sal 2,4-D isopropilamina³; Sal 2,4-D tri-isopropanolamina⁴; Éster 2,4-D 2-butoxietyl⁵; Éster 2,4-D 2- etilhexilo⁶; Éster 2,4-D isopropil⁷.

Fonte: Adaptado EPA, 2005.

Para prevenir problemas de contaminação do homem com pesticidas presentes na água, os países da Comunidade Europeia adoptaram como concentração máxima admissível (MAC) 0,1 µg/L por composto na água potável, sendo este limite ultrapassado ao ser considerado a soma de todos os compostos (0,5 µg/L). Limites semelhantes são adoptados por outros países como Estados Unidos e Canadá (Carney, 1991, Walker *et al.*, 2000). No Brasil, a Portaria nº1469 do Ministério da Saúde (de 29 de dezembro de 2000), que indica os limites máximos de pesticidas em água, estabelece 30,0 µg/L como máximo aceitável para o 2,4-D em águas e solos (Brasil, 2000).

1.1.2. Mecanismo de acção do ácido 2,4-diclorofenoxiacético nas plantas dicotiledóneas

A actividade biológica de um herbicida na planta ocorre de acordo com a absorção, a translocação, o metabolismo e a sensibilidade da planta a este herbicida e/ou, aos seus metabolitos. Deste modo, o simples facto de um herbicida atingir as folhas e/ou, ser aplicado no solo não é suficiente para que ele exerça a sua acção. Há necessidade de que ele penetre na planta, transloque e atinja o organelo onde irá actuar (Ferreira *et al.*, 2005).

Um mesmo herbicida pode influenciar vários processos metabólicos na planta, no entanto, a primeira lesão biofísica ou bioquímica que ele causa é caracterizada como sendo o seu mecanismo de acção (Ferreira *et al.*, 2005).

O Ácido 2,4-diclorofenoxiacético é um herbicida auxínico que induz mudanças metabólicas e bioquímicas, podendo ocasionar a morte em plantas dicotiledóneas sensíveis (Ferreira *et al.*, 2005).

Sob acção dos herbicidas auxínicos, o metabolismo dos ácidos nucleicos e os aspectos metabólicos da plasticidade da parede celular da planta são seriamente afectados. Estes produtos interferem na acção da enzima RNA-polimerase e, consequentemente, na síntese de ácidos nucleicos e proteínas. Induzem intensa proliferação celular em tecidos, causando epinastia das folhas e caule, além da interrupção do floema, impedindo o movimento dos fotoassimilados das folhas para o sistema radicular. O alongamento celular parece estar relacionado com a diminuição do potencial osmótico das células, provocado pela acumulação de proteínas e, também, mais especificamente, pelo efeito desses produtos sobre a perda de rigidez das paredes celulares. Essa perda da rigidez das paredes celulares é provocada pelo incremento na síntese da enzima celulase. Após aplicações dos herbicidas, em plantas sensíveis, verificam-se rapidamente aumentos significativos da enzima celulase, especialmente da carboximetilcelulase, nas raízes. Devido a esses efeitos ocorre a epinastia das folhas, retorcimento do caule, engrossamento das gemas terminais, destruição do sistema radicular e morte da planta, em poucos dias ou semanas (Ferreira *et al.*, 2005).

A selectividade pode ser dependente de diversos factores, tais como: arranjo do tecido vascular em feixes dispersos, sendo estes protegidos pelo esclerênquima em gramíneas; a hidroxilação, proveniente do metabolismo do 2,4-D e derivados, resulta na perda da capacidade auxínica, além de facilitar a sua conjugação com aminoácidos e outros constituintes em plantas tolerantes; algumas espécies de plantas podem ainda excretar estes herbicidas para o solo através de seu sistema radicular (exsudação radicular); e o estágio de desenvolvimento da planta, no momento da aplicação do herbicida, pode garantir a selectividade de algumas auxinas sintéticas em culturas como arroz, trigo e milho (Ferreira *et al.*, 2005).

1.2. Toxicidade do ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Para Neely (1994), a avaliação do risco ambiental é a caracterização do efeito potencial adverso que este causa em seres humanos e no ambiente que encontram-se expostos a químicos.

Com poucas excepções, os efeitos e a toxicidade relativa dos derivados do herbicida 2,4-D, em forma de sal ou de éster, são bastante semelhantes aos da forma ácida. Assim, a forma ácida do 2,4-D foi seleccionada como sendo representativa de todos os derivados no processo de registro padrão que monitoriza os resultados obtidos nos estudos realizados pelo EPA (Processo nº 0073). O ácido 2,4-diclorofenoxiacético e seus derivados exibem, em geral, uma toxicidade aguda leve, com excepção da forma ácida e de sal serem gravemente irritantes para os olhos com toxicidade listada na categoria I (Harris e Solomon, 1992).

Nos estudos da toxicidade aguda, o 2,4-D apresenta baixa toxicidade de exposição, definidas nas categoria III ou IV, quer seja em termos de exposição por via oral, dérmica ou inalatória (Harris e Solomon, 1992).

A toxicidade aguda de todas as formas do herbicida 2,4-D, pode ser observada no Quadro 1.3.

Quadro 1.3 - Dados de toxicidade aguda do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e derivados.

Ação	Número MRID	Ácido 2,4-D e derivados	Resultado	Categoria da toxicidade
Oral Aguda	00101605	Ácido 2,4-D	LD50 = 639 mg/kg (Rato)	III
	41920901	Sal DEA ¹	LD50 = 735 mg/kg (Rato)	III
	00157512	Sal DMA ²	LD50 = 949 mg/kg (Rato)	III
	00252291	Sal IPA ³	LD50 = 1646 mg/kg (Rato)	III
	41709901	Éster IPE ⁴	LD50 = 1250 mg/kg (Rato)	III
	41413501	Sal TIPA ⁵	LD50 = 1074 mg/kg (Rato)	III
	40629801	Éster BEE ⁶	LD50 = 866 mg/kg (Rato)	III
	41209001	Éster EHE ⁷	LD50 = 896 mg/kg (Rato)	III
Dérmica aguda	00101596	Ácido 2,4-D	LD50 >2000 mg/kg (Coelho)	III
	41920911	Sal DEA	LD50 >2000 mg/kg (Coelho)	III
	00157513	Sal DMA	LD50 1829 mg/kg (Coelho)	III
	00252291	Sal IPA	LD50 >2000 mg/kg (Coelho)	III
	41709902	Éster IPE	LD50 >2000 mg/kg (Coelho)	III
	41413502	Sal TIPA	LD50 >2000 mg/kg (Coelho)	III
	40629802	Éster BEE	LD50 >2000 mg/kg (Coelho)	III
	41209002	Éster EHE	LD50 >2000 mg/kg (Coelho)	III
Inalação aguda	00161660	Ácido 2,4-D	LC50 >1.79 mg/L (Rato)	III
	41986601	Sal DEA	LC50 >3.5 mg/L (Rato)	IV
	00157514	Sal DMA	LC50 >3.5 mg/L (Rato)	IV
	40085501	Sal IPA	LC50 =3.1 mg/L (Rato)	IV
	40352701	Éster IPE	LC50 >4.97 mg/L (Rato)	IV
	41957601	Sal TIPA	LC50 =0.78 mg/L (Rato)	III
	40629803	Éster BEE	LC50 =4.6 mg/L (Rato)	IV
	42605202	Éster EHE	LC50 >5.4 mg/L (Rato)	IV

Continuação do Quadro 1.3.

Ação	Número MRID	Ácido 2,4-D e derivados	Resultado	Categoria da toxicidade
Irritação ocular primária	41125302	Ácido 2,4-D	Severamente irritante	I
	41920902	Sal DEA	Severamente irritante	I
	00157515	Sal DMA	Severamente irritante	I
	00252291	Sal IPA	Severamente irritante	I
	40352702	Éster IPE	Não irritante	IV
	41413504	Sal TIPA	Severamente irritante	I
	40629804	Éster BEE	Não irritante	III
	44725303	Éster EHE	Não irritante	III
Irritação cutânea primária	42232701	Ácido 2,4-D	Inaceitável	N/A
	41920903	Sal DEA	Ligeiramente irritante	III
	00157516	Sal DMA	Ligeiramente irritante	IV
	00252291	Sal IPA	Ligeiramente irritante	IV
	40352703	Éster IPE	Ligeiramente irritante	IV
	41413505	Sal TIPA	Ligeiramente irritante	IV
	40629805	Éster BEE	Irritante leve	IV
	41413505	Éster EHE	Não irritante	IV
Sensibilização dérmica	00161659	Ácido 2,4-D	Não é um sensibilizador cutâneo	N/A
	41920904	Sal DEA		
	41642805	Sal DMA	Não é um sensibilizador cutâneo	
	41233701	Sal IPA	Inaceitável	
	40352704	Éster IPE	Inaceitável	
	41413506	Sal TIPA	Não é um sensibilizador cutâneo	
	40629806	Éster BEE		
	41209006	Éster EHE	Não é um sensibilizador cutâneo	
			Não é um sensibilizador cutâneo	
			Inaceitável	

*N/A: Não avaliado. Categoria: I- Toxicidade severa; II-Toxicidade forte; III- Toxicidade média; IV-Toxicidade ligeira ou ausente.

*Sal 2,4-D di-etanolamina¹; Sal 2,4-D di-metilamina²; Sal 2,4-D isopropilamina³; Éster 2,4-D isopropil⁴; Sal 2,4-D tri-isopropanolamina⁵; Éster 2,4-D 2-butoxietyl⁶; Éster 2,4-D 2- etilhexilo⁷.

Fonte: Adaptado EPA, 2005

Os mecanismos responsáveis pela depuração renal do 2,4-D têm sido investigados em várias espécies, sendo secretado activamente pelo túbulo proximal. Este mecanismo de depuração renal é consistente com os resultados observados com outros ácidos fenóxi (EPA, 2005).

No que diz respeito à administração repetida do 2,4-D, o cão é mais sensível aos efeitos deste herbicida do que o rato, devido à capacidade limitada de excretar ácidos orgânicos. Estudos em animais de laboratório, após a exposição sub-crônica oral em doses acima do limite de saturação para a depuração renal do 2,4-D, conduziram a vários resultados em diferentes órgãos. Alterações nos sistemas reprodutivos foram observadas após a exposição aos derivados do ácido 2,4-diclorofenoxiacético. A toxicidade sistêmica não foi observada após repetidas administrações dérmicas do 2,4-D, EHE, TIPA, BEE e IPA. A toxicidade no fígado foi observada após doses repetidas de administração dérmica de DEA, e um óbito ocorreu após administração de repetidas doses cutâneas de DMA (Feldmann e Maibach, 1974).

Em geral, os produtos químicos tendem a ser mais tóxicos por inalação do que por via oral, devido à rápida absorção e distribuição (EPA, 2005).

A avaliação do risco por inalação é baseada em dados orais. No entanto, no caso do 2,4-D e face ao número limitado de dados obtidos por via oral, considera-se que a fracção à qual o corpo estará exposto será a mesma para ambas as vias de exposição. Os efeitos observados na via de entrada, só podem ser avaliados em um estudo de inalação. Portanto, para um estudo de inalação subcrónica (28 dias) do 2,4-D, é necessário avaliar a toxicidade no desenvolvimento, caracterizada por anomalias em ratos após a exposição ao 2,4-D e derivados, com doses iguais ou superiores ao limiar de saturação da depuração renal (Feldmann e Maibach, 1974).

Na reprodução, a exposição da dose de 2,4-D acima do limiar de saturação renal aumentaram a duração do tempo de gestação em animais de laboratório (EPA 2005). No que diz respeito à neurotoxicidade, foram observadas após a administração de doses relativamente elevadas do 2,4-D e derivados, sinais clínicos de neurotoxicidade em coelhas gestantes.

Após a administração aguda do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, foram observadas incoordenação e anormalidades de marcha ligeira. O 2,4-D é classificado como uma substância química do Grupo D, não classificável como cancerígeno para humanos. Baseado no padrão geral das respostas observadas, quer em testes *in vitro*, quer em testes de genotoxicidade *in vivo*, o 2,4-D não apresentou mutagenicidade, apesar de se terem observado alguns efeitos citogénicos. O ácido 2,4-D é considerado actualmente como o representante de todos os nove produtos químicos derivados do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (EPA, 2005).

Os parâmetros toxicológicos que foram utilizados para concluir as avaliações de risco neste tópico encontram-se resumidos no anexo II. Estes parâmetros foram seleccionados pela Agência de Protecção Ambiental e Substâncias Tóxicas em Junho 2005, a partir de uma avaliação dos estudos existentes sobre os efeitos tóxicos do 2,4-D em animais (EPA, 2005).

1.3. Impacto ambiental

Para Spadotto *et al.* (2004), os efeitos ambientais de um pesticida dependem da sua toxicidade nos organismos terrestres e aquáticos, além das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, biota e atmosfera), que por sua vez, dependem do modo e das condições de aplicação, da quantidade ou dose usada, do comportamento e destino do pesticida no meio ambiente. A Figura 1.3 apresenta um esquema da mobilização que pode ser alcançada por um pesticida em contacto com o ambiente.

Assim que aplicados, os pesticidas são submetidos a uma série de processos que englobam reacções químicas e processos físicos e biológicos. Os resultados desses processos e das interacções é que determinam o comportamento e o destino destes no ambiente.

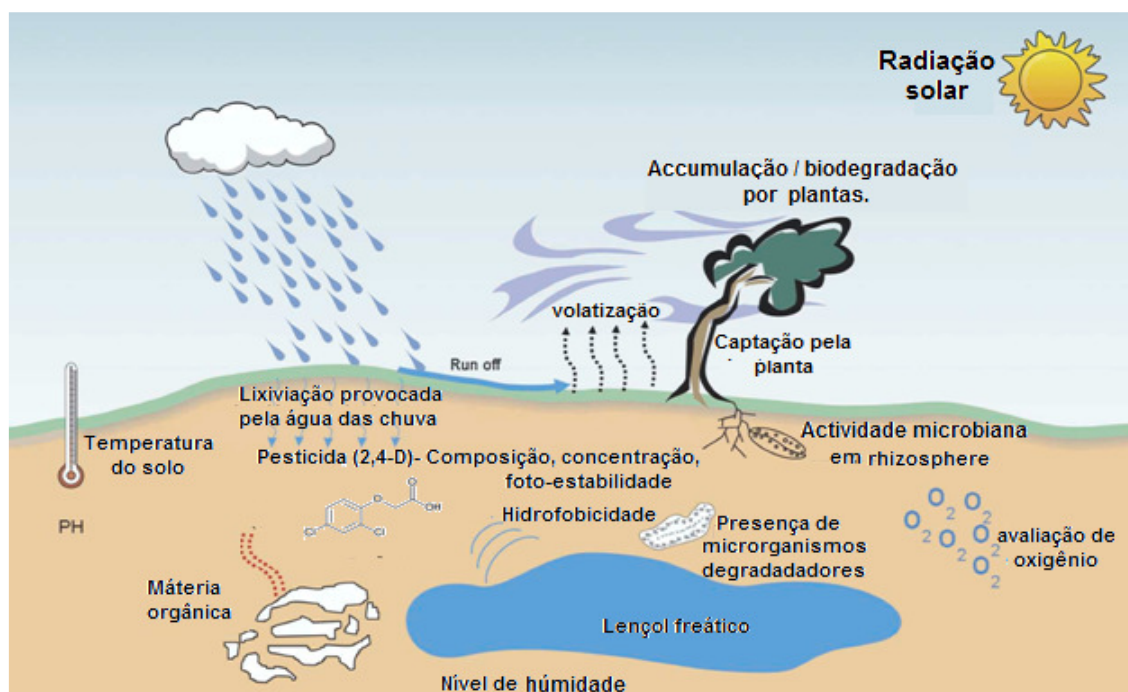


Figura 1.3 - Possíveis mobilizações do 2,4-D no ambiente.

Fonte: Adaptado Atterby *et al.*, 2002.

Os pesticidas, devido às suas propriedades físico-químicas, podem ter diferentes afinidades: alguns pela matéria sólida do solo, outros pela matéria orgânica e outros pela circulação de soluções aquosas através do solo. Esses diferentes comportamentos dos pesticidas são determinantes no processo de contaminação ambiental (Atterby *et al.*, 2002).

Desta forma, se um pesticida tem baixa afinidade com a matéria sólida ou com a matéria orgânica do solo, e alta afinidade com a água, existe grande possibilidade de que, por lixiviação, aquela substância química venha a ser um contaminante de águas subterrâneas. Por outro lado, se o pesticida tem uma alta afinidade pela matéria orgânica ou pela matéria sólida e baixa afinidade pela solução aquosa, então o composto pode ser adsorvido ou absorvido nas partículas do solo, transportado para os corpos de água superficiais e dessa forma contaminá-los. (Paraíba *et al.*, 2005).

Os microrganismos e as plantas estão entre os agentes biológicos mais importantes, porque são capazes de remover e degradar os resíduos para permitirem a sua reciclagem no ambiente. Embora estes agentes estejam adaptados

para enfrentar mais naturalmente estes resíduos, muitas substâncias químicas sintéticas modernas apresentam um desafio à sua capacidade de remediação, entre elas a presença dos diversos pesticidas aplicados ao solo (Atterby *et al.*, 2002).

O facto de algumas substâncias químicas poderem persistir no ambiente por longos períodos é, por si, um indicativo das limitações dos processos de degradação natural. Um exemplo particular é os inseticidas organoclorados e carbamatos, que foram inicialmente desenvolvidos durante os anos 1940 a 1960. O uso difundido de fibras sintéticas de pesticidas na agricultura e na saúde pública que se seguiu, levou aos temores sobre a resistência destas substâncias químicas tóxicas na bioacumulação ambiental, traduzindo-se na cadeia alimentar e em riscos para as espécies não-alvo (Atterby *et al.*, 2002).

Embora a maioria dos pesticidas recentemente desenvolvidos sejam menos persistentes ou bioacumuláveis, muitos são móveis no ambiente como é o caso do herbicida 2,4-D, que devido à sua afinidade pela água é detectado em águas superficiais (Walker *et al.*, 2000). Vestígios de pesticidas podem ser encontrados na chuva, nevoeiros e neve, através de processos de infiltração e run-offs, e dos ciclos contínuos de volatilização e condensação. Os pesticidas utilizados em solos podem terminar nos sistemas aquáticos (Rice, 1996; Dubus *et al.*, 2000).

Os processos naturais que decompõem substâncias tóxicas no meio ambiente têm-se tornado o foco de atenção conduzindo ao desenvolvimento de tecnologias de remediação para um ambiente seguro e amigável. Os processos envolvidos na biodegradação de pesticidas, tais como oxidação, hidroxilação do anel aromático, dissociação, hidrólise, desalogenação, desalquilação, ou formação de conjugado, têm sido muito estudados nos últimos anos, o que tem proporcionado uma base para a utilização adequada e reforçada dos microrganismos e plantas na remediação de sítios contaminados (Mulbry e Kearney, 1991; Chaudhry *et al.*, 2002).

Tanto a biorremediação com o uso de microrganismos, como a fitorremediação com uso de plantas, oferecem a possibilidade de baixo custo, recursos ecológicos e renováveis para a remediação *in situ* de ambientes

contaminados que são muito mais rentáveis do que qualquer descontaminação pela técnica *ex-situ* (Atterby *et al.*, 2002).

Mulbry e Kearney (1991) descreveram que a *Pseudomonas* sp. e *Klebsiella pneumoniae* possuem hidrolases que são capazes de quebrar os herbicidas s-triazinas, como a atrazina, que devido à sua solubilidade em água e a sua persistência podem lixiviar nas águas subterrâneas. Da mesma forma, uma série de enzimas como oxigenases, hidroxilases, hidrolases e isomerases presentes em *Pseudomonas* sp e *Alcaligenes* apresentaram capacidade para degradar o herbicida 2,4-D.

Quer as bactérias quer os fungos podem degradar os pesticidas orgânicos persistentes por clivagem hidrolítica e degradar os piretróides (por exemplo, permetrina) por meio de clivagem da ligação éster. Com a exceção de di-tio-carbamatos, a degradação microbiana de todos os tipos de pesticidas carbamatos também tem sido demonstrada; por exemplo, a rápida hidrólise do carbaril foi relatada devido à presença da enzima esterase carbaril de *Pseudomonas* sp. (Mulbry e Kearney, 1991). Algumas estirpes de *Pseudomonas* têm sido geneticamente modificadas para conferir a capacidade de degradar substâncias químicas persistentes, como clorobenzenos que são normalmente usados na síntese de pesticidas (Wackett *et al.*, 1994).

Os herbicidas constituídos por pontes ésteres do 2,4-D, são rapidamente hidrolisados em ambientes aquáticos com pH alcalino, suspensões de solo, da água e solos húmidos. Os sais amina de 2,4-D apresentam dissociação rápida em água. No entanto, os ésteres podem persistir sob condições aquáticas ácidas e em solo seco. Estes dados obtidos indicam a formação de ponte de ésteres e aminas na maioria das condições ambientais, que se degradam rapidamente formando o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (EPA,2005).

O banco de dados do EPA (2005) mostrou que a dissipação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético no ambiente é dependente da mineralização microbiana, da fotodegradação oxidativa na água e lixiviação, sendo o xenobiótico estável à hidrólise por factores abióticos.

Em meio aquoso, a degradação microbiana é um caminho possível para a quebra do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, mas é muito dependente das características da água: nível de nutrientes presentes, temperatura e disponibilidade de oxigénio (Howard, 1991).

Ghassemi *et al.* (1981), apresentou através de estudos laboratoriais que para a degradação microbiana do 2,4-D ser eficaz, a água deve ser rica em nutrientes. Entretanto, as águas de superfície apresentaram uma quantidade de nutrientes inferior do que a necessária para manter as populações de microrganismos capazes de degradar o herbicida, facilitando a mobilização no meio ambiente. A biodegradação do herbicida pode ser aeróbia ou anaeróbia, embora a degradação anaeróbia seja relativamente lenta, com uma meia-vida de 312 dias.

A degradação por fotólise em meio aquoso só assume um papel importante quando a degradação microbiana é lenta, pois o tempo de meia-vida é de 13 dias a 25 °C na presença de água destilada e luz UV incidente de forma directa. No ambiente natural, a fotodegradação passa a não ter relevância, devido à baixa incidência dos raios UV na água, além da retenção da energia pela matéria orgânica em suspensão (Ghassemi *et al.*, 1981).

No solo, o destino do 2,4-D pode ser afectado por vários processos, incluindo o escoamento superficial, adsorção, degradação química e microbiológica, fotodecomposição e lixiviação. A solubilidade em água e o coeficiente de adsorção do solo (K_{oc}) indicam a mobilidade potencial de um produto químico no solo, enquanto que a persistência é determinada pelo metabolismo aeróbio e anaeróbio, a hidrólise e a taxa de dissipação (Lilienfeld e Gallo, 1989).

O 2,4-D foi relatado como possuindo uma persistência moderada no solo com uma meia-vida de dissipação do campo de 59,3 dias, meia-vida aeróbia de 66 dias, e com meia-vida de 39 dias por hidrólise (Hermosin e Cornejo, 1991).

Hermosin e Cornejo (1991) relataram que, usando uma análise de regressão simples entre as propriedades e as capacidades de adsorção do solo, a matéria orgânica e o ferro livre favorecem a adsorção do 2,4-D, enquanto que o pH elevado,

uma grande área de superfície, e a presença de filossilicatos como componentes essenciais da argila diminuem a adsorção do herbicida.

A degradação microbiana é considerada a principal via na decomposição de 2,4-D no solo. O mecanismo mais importante da degradação bacteriana envolve a remoção da cadeia lateral de ácido acético para produzir 2,4-diclorofenol (DCP). Posteriormente, ocorre a clivagem do anel aromático, produzindo ácidos alifáticos, tais como succinato (Ghassemi *et al.*, 1981).

A taxa de degradação microbiana mostrou-se dependente do potencial hídrico, profundidade e temperatura do solo. Han e New (1994) constataram que em solos arenosos com baixo potencial hídrico, as bactérias (actinomicetas) e os fungos filamentosos, apresentam as menores taxas de degradação. Solos secos contribuíram para a inibição da mineralização do 2,4-D, pois restringem a mobilidade do soluto, diminuem a actividade de degradação dos microrganismos e suprimem a população microbiana responsável pela degradação do herbicida. A adição de matéria orgânica em solos secos aumentou a degradação devido ao co-metabolismo existente nas comunidades de fungos e actinomicetas (Han e New, 1994). A taxa do metabolismo microbiano foi diminuindo com a profundidade e com temperaturas mais baixas (Veeh *et al.*, 1996).

A degradação no solo também pode ser afectada pela taxa de adsorção-dessorção de 2,4-D sobre as partículas presentes que se ligam ao herbicida, tornando-o indisponível para a degradação microbiana (Bolan e Baskaran, 1996). Bolan e Baskaran (1996) constataram que o teor de carbono orgânico do solo aumentou para 12% a taxa de adsorção, sendo observado uma diminuição da taxa de degradação devido a baixas concentrações de 2,4-D disponível para o ataque microbiano.

A fotodegradação sobre as superfícies do solo desempenha um papel muito menor na degradação do 2,4-D e só ocorre sobre a parte superior do solo. Em um estudo de fotólise realizado em uma indústria de 2,4-D, não foram encontrados produtos de degradação com concentrações superiores a 1,1%, indicando que o 2,4-D é muito resistente à fotodegradação em solos (Tamma-Vithala, 1989).

O grau de lixiviação e o escoamento superficial de 2,4-D pode ser influenciado pela: formulação, propriedade do solo, declividade e pela intensidade das chuvas. O 2,4-D é escoado em maior quantidade pela chuva se o evento ocorrer pouco após a aplicação do herbicida no solo, sendo lixiviado em concentrações decrescentes ao longo do tempo (Stearman e Wells, 1997). Grover (1977), verificou que para a lixiviação do 2,4-D, a partir de solos com alto teor biológico, é necessário um maior volume de água. Além disso solos com pH acima de 7,5 facilitam a lixiviação do herbicida, reflectindo em uma maior adsorção à matéria orgânica pelos solos mais ácidos (Hillel, 1982).

Os esquemas apresentados nas Figuras 1.4 e 1.5, reúnem, resumidamente, os principais destinos descritos para o ácido 2,4-diclorofenoxiacético no ambiente.

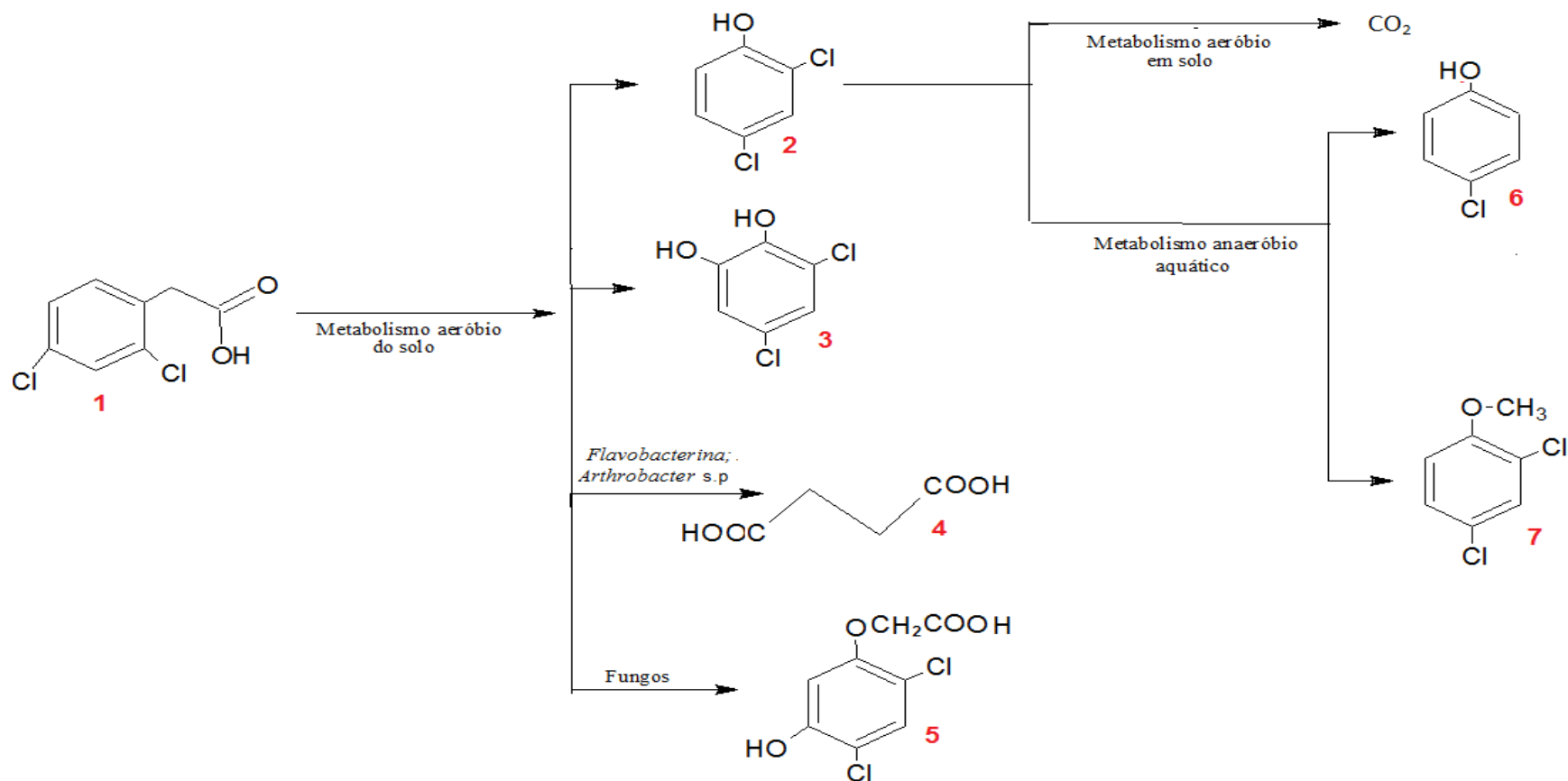


Figura 1.4 - Vias de degradação do 2,4-D no ambiente. Legenda: ¹ácido 2,4-diclorofenoxiacético; ²2,4-diclorofenol (DCP); ³2,4-diclorocatecol; ⁴succinato; ⁵ácido 2,4-dicloro-5-hidroxifenoxiacético; ⁶4-clorofenol; ⁷2,4-dicloroanisol. CO₂-corresponde ao dióxido de carbono libertado

Fonte: Adaptado Walters, 2010.

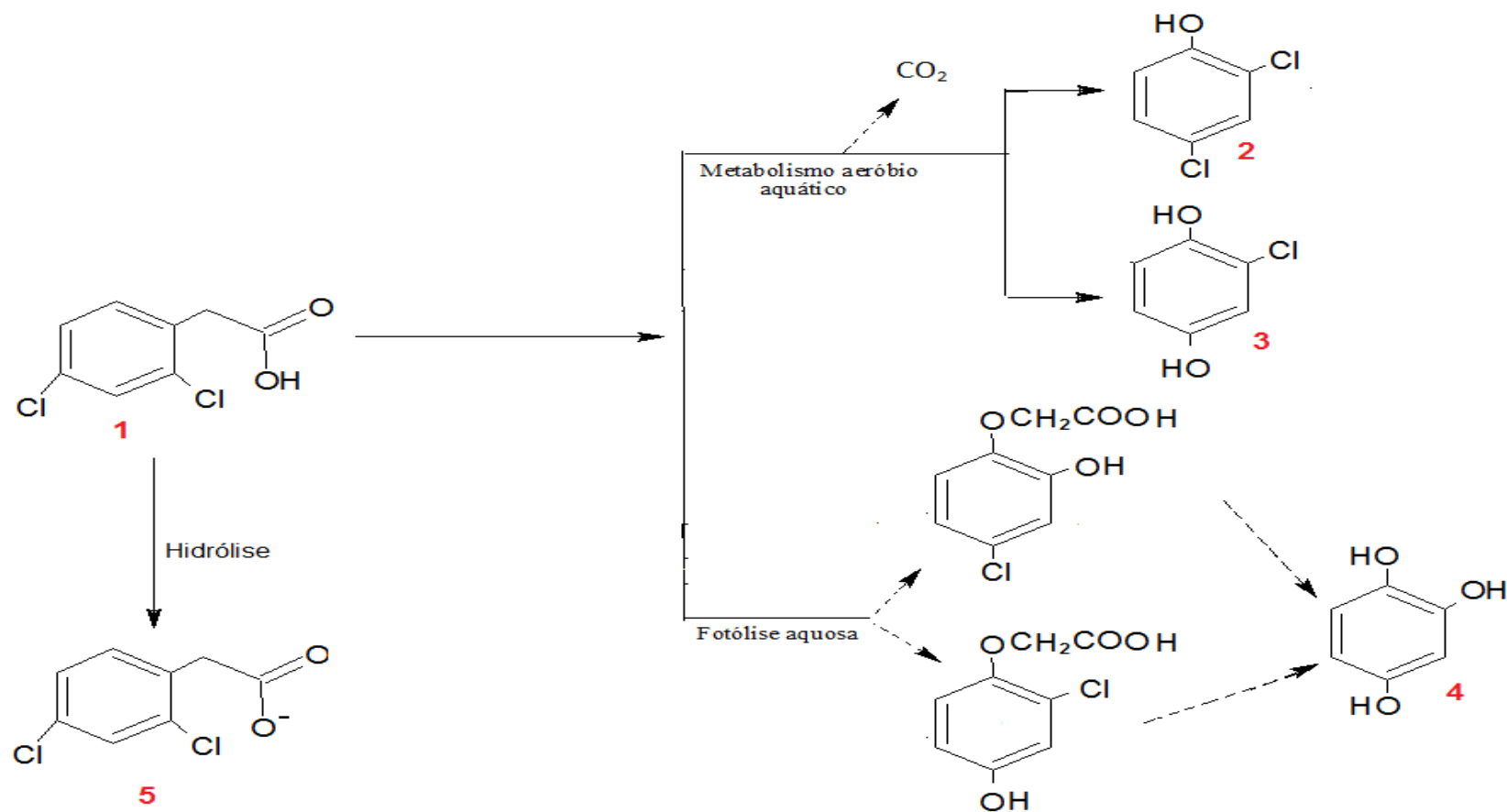


Figura 1.5 – Vias de degradação do 2,4-D no ambiente (II). Legenda: ¹ácido 2,4-diclorofenoxiacético; ²2,4-diclorofenol (DCP); ³clorohidroquinona; ⁴1,2,4-benzenotriol; ⁵ânion do 2,4-D.

Fonte: Adaptado Walters, 2010.

1.4. Vias de biodegradação por microrganismos descritas para o ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Diversos microrganismos estão envolvidos na biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, porém, poucas são as vias descritas para a metabolização do herbicida.

Fukumori e Hausinger (1993), relataram o envolvimento dos genes contidos nos plasmídeos envolvidos na degradação do 2,4-D por *Alcaligenes paradoxus*. Posteriormente, outras estirpes de bactérias contendo os genes plasmídicos foram isoladas, e em todos os casos, verificou-se que apresentavam a capacidade para degradar o herbicida.

Um destes plasmídios é o pJP4, que foi primeriamente isolado na Austrália, a partir da *Alcaligenes eutrophus* JMP134. O plasmídeo contém os genes da via *tfd* de degradação do herbicida, sendo esta a única via completamente caracterizada para a degradação do 2,4-D (Fukumori e Hausinger, 1993). Esta via encontra-se apresentada na Figura 1.6.

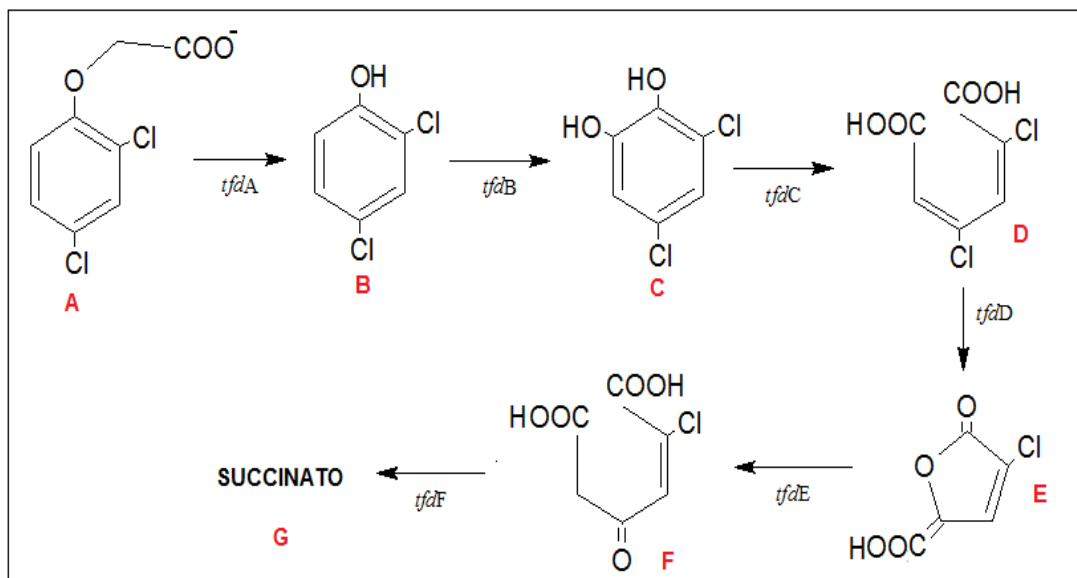


Figura 1.6 - Via descrita para a degradação do 2,4-D por *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Legenda- A: 2,4-diclorofenoxiacetato; B: 2,4-diclorofenol; C: 3,5-diclorocatecol; D: 2,4-dicloro-cis,cis-muconato; E: cis-2-clorodieno lactona; F: 2-cloromaleilacetato; G: succinato.

Fonte: Adaptado Fukumori e Hausinger, 1993.

A via descrita para a biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético por *Alcaligenes eutrophus* JMP134, envolve a remoção da cadeia lateral, com o resultado da hidroxilação do 2,4-D a diclorofenol. Após a formação do 2,4-diclorofenol ocorre a orto clivagem produzindo o 3,5-diclorocatecol, seguido da conversão a 2,4-dicloro-cis,cis-muconato, com uma posterior oxidação a 2-cloromaleilacetato e por fim, a formação do succinato (Fukumori e Hausinger, 1993).

Os genes *tfdA*, *tfdB*, *tfdC*, *tfdD*, *tfdE* e *tfdF* codificam, respectivamente as enzimas α -cetoglutarato dioxigenase, 2,4-diclorofenol hidroxilase, clorocatecol 1,2-dioxigenase, cloromuconato cicloisomerase, dienalactona hidrolase e maleilacetato redutase utilizadas na biodegradação do herbicida (Fukumori e Hausinger, 1993).

Kearney e Kaufman (1975) descreveram que a degradação do 2,4-D por *Pseudomonas* sp. ocorre via fenol correspondente, ou seja, não ocorre a hidroxilação a 2,4-diclorofenol, cuja metabolização acontece directamente com a formação do 3,5-diclorocatecol. A degradação por *Arthobacter* sp. apresenta-se semelhante à via metabólica descrita para o *Alcaligenes eutrophus* JMP134. As possíveis vias de degradação do 2,4-D para a *Pseudomonas* sp. e *Arthobacter* sp. encontram-se descritas na Figura 1.7.

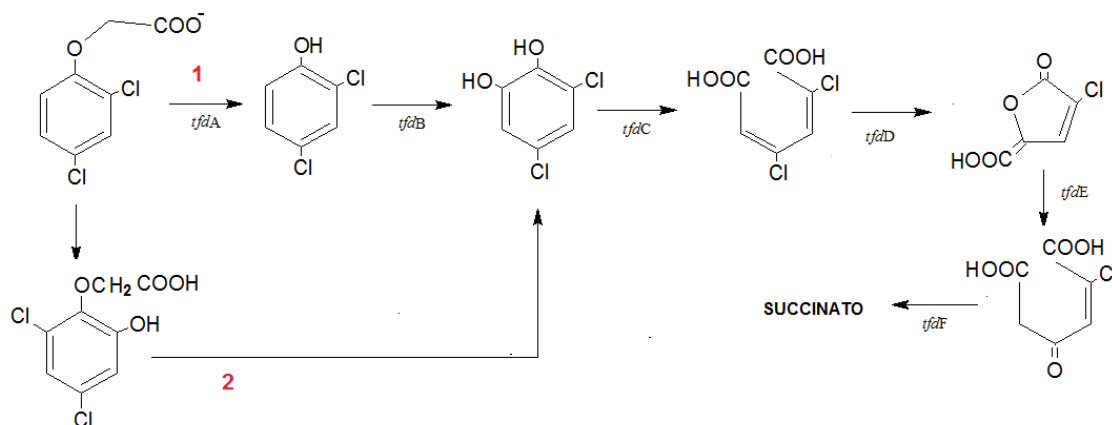


Figura 1.7 - Vias descritas para a degradação do 2,4-D por *Arthobacter* sp. (1) e *Pseudomonas* sp. (2).

Fonte: Adaptado Kearney e Kaufman 1975.

A sequência do gene *tfdB* envolvido na metabolização do 2,4-diclorofenol, apresenta semelhanças com outros genes envolvidos na hidroxilação de fenol por diversos microrganismos, existindo portanto, vários estudos sobre a via metabólica a partir desta hidroxilação (Saari *et al.*, 1999). No entanto, a sequência do gene *tfdA* que codifica a proteína responsável pela hidroxilação do herbicida não apresenta relações evolutivas óbvias com quaisquer outros genes conhecidos (Westendorf *et al.*, 2003), sendo a sua via pouco estudada.

Geralmente, a mono-oxigenase do 2,4-D tem sido descrita como o produto do gene *tfdA* (Westendorf *et al.*, 2003). Entretanto, tem sido demonstrado que a enzima estaria implicada numa via de degradação semelhante às reacções catalisadas por um grupo de dioxigenase cetoglutarato-dependente (KG) (Nickel *et al.*, 1999). Esta reacção requer um grupo KG e Fe (II), além do 2,4-D e oxigénio, produzindo CO₂ succinato, 2,4-diclorofenol e glioxilato. A reacção pode ser melhor visualizada na Figura 1.8.

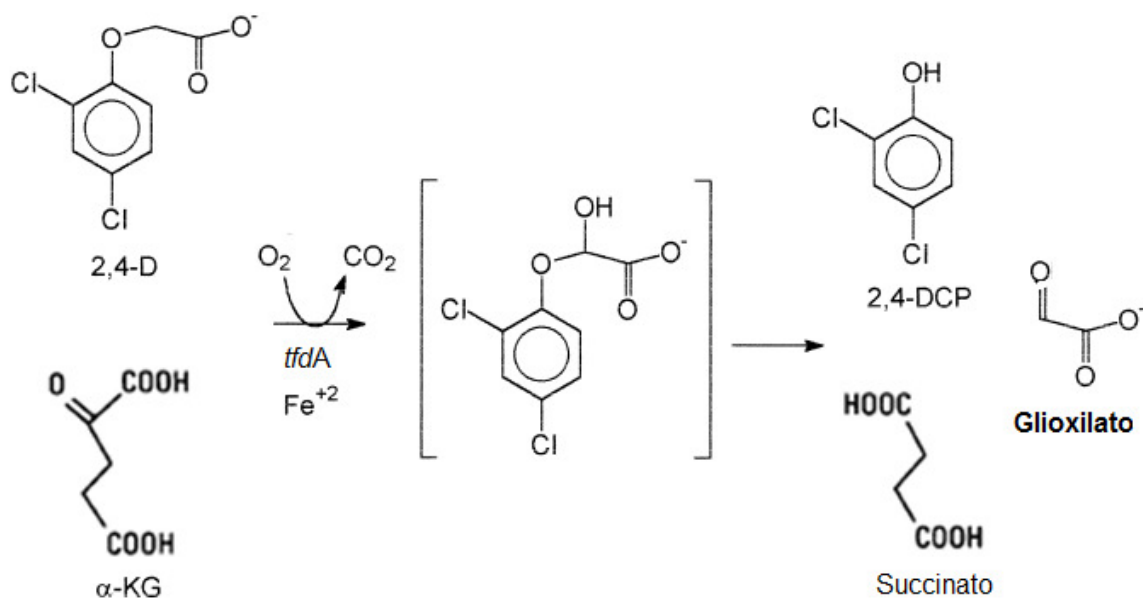


Figura 1.8- Reacção global do 2,4-D via dioxigenase α-cetoglutarato-dependente.

Fonte: Adaptado Saari et al. 1999

A disponibilidade do substrato, segundo esta reacção, tem o potencial de controlar a degradação do herbicida. Porém, para a catálise ser mantida, o

α -cetoglutarato (α -Keto) que é oxidado e descarboxilado inicialmente, deve ser regenerado (Muller, 2007).

O α -cetoglutarato está fortemente implicado no metabolismo do 2,4-D, enquanto que a reposição dos metabolitos, por sua vez, depende da reação de clivagem inicial. É importante notar que a regeneração do α -cetoglutarato é acompanhada por uma perda substancial de carbono na forma de CO_2 , que neste caso é proveniente da quebra do 2,4-D. Segundo Muller (2007), a regeneração do α -Keto é obtida através do glioxilato. Este esquema pode ser observado na Figura 1.9.

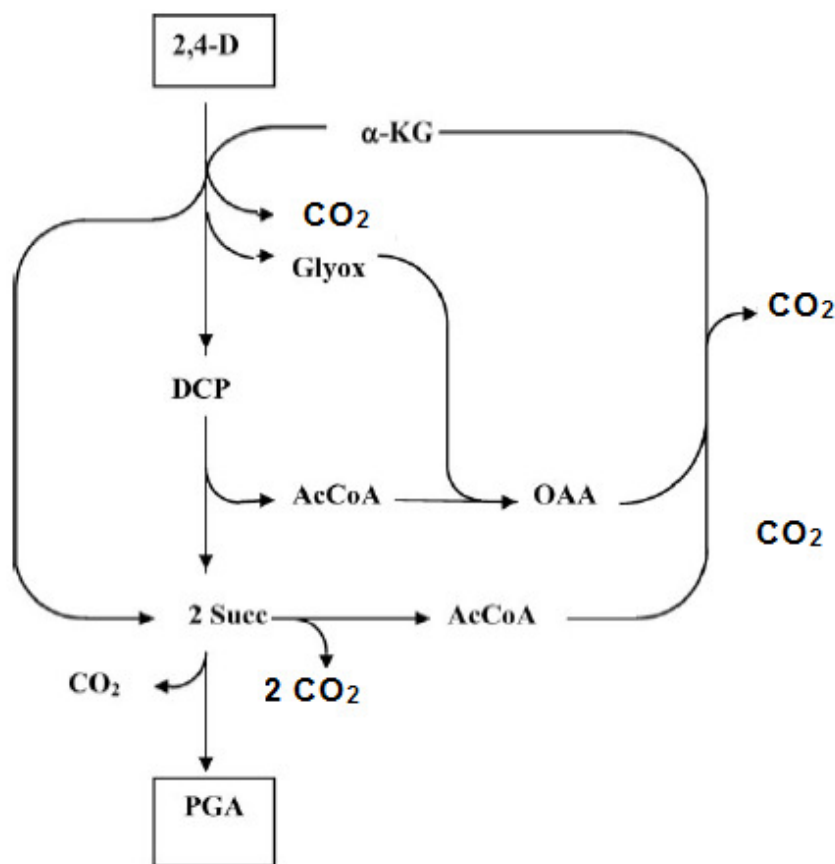


Figura 1.9 - Via metabólica proposta para a regeneração do α -cetoglutarato e para a síntese de 3-fosfoglicerato (PGA) como um precursor da síntese de biomassa durante a conversão do 2,4-D. Abreviaturas: AcCoA: acetil-coenzimaA; DCP, 2,4-diclorofenol; glyox: glioxilato; OAA: Oxalacetato; Succ: succinato. O CO_2 é perdido durante a regeneração do α -Keto.

Fonte: Adaptado Muller, 2007

A perda de carbono sob forma de dióxido de carbono aumenta o déficit na disponibilidade de metabolitos, além das restrições levantadas pelos termos cinéticos com este substrato. O atraso e mesmo a cessação da degradação poderá ser observada em ensaios com diferentes microrganismos que seguem a via metabólica α -cetoglutarato-dependente, sendo atribuída a esta dependência a causa mais provável para a diminuição ou paragem da degradação do herbicida (Muller, 2007).

1.5. Metabolismo *versus* Cometabolismo

O metabolismo é a utilização dos xenobióticos pelos microrganismos, derivando algum benefício nutricional devido ao uso do composto como fonte de carbono, energia e outros nutrientes (Govlev, 1978). Este processo resulta na completa mineralização das moléculas orgânicas, isto é, a sua conversão para dióxido de carbono (CO_2), água e iões inorgânicos (Silva e Fay, 2003).

A via metabólica da mineralização consiste em uma sequência de transformações, cujo propósito é a conversão do xenobiótico em moléculas que possam ser processadas pelo metabolismo intermediário ou central do microrganismo, servindo como precursores para a biossíntese dos constituintes celulares (Janke e Fritsche, 1985).

Dalton e Stirling (1982) definem o cometabolismo microbiano como sendo a transformação de um substrato que não promove o crescimento (“non-growth substrate”) na presença obrigatória de um substrato de crescimento (“growth substrate”) ou de outro composto que é susceptível de sofrer transformação. É, no entanto, frequentemente observado a capacidade de algumas espécies para transformarem estes xenobióticos. O processo de transformação deste tipo, são usualmente mediados por enzimas não específicas do metabolismo celular periférico capazes de modificarem uma variedade de substratos, para além dos seus substratos naturais (Janke e Fritsche, 1985).

O processo de cometabolismo mostrou-se muito importante para a biorremediação. Este fenómeno oferece um grande potencial nas tecnologias de tratamento ambiental, uma vez que a população microbiana pode crescer em altas concentrações de uma fonte inócua de carbono e desta forma conseguir degradar os contaminantes ambientais (Silva e Fay, 2003). A utilidade do processo de cometabolismo tem sido demonstrado com a degradação de uma variedade de poluentes, incluindo derivados do petróleo (Borja *et al.*, 2005), bifenilos policlorados (Borja *et al.*, 2005) e herbicidas clorados (Bollag e Liu, 1990).

1.5.1. Influência dos co-substratos na degradação do 2,4-D

Para Janke e Fritsche (1985), o grupo de enzimas oxigenases é o mais comumente associado à transformação cometabólica. Outras enzimas, como as hidrolases e as redutases e mesmo os co-factores enzimáticos, como vitaminas e os metais, também estão envolvidos na transformação dos xenobióticos recalcitrantes.

Fukumori e Hausinger (1993), descrevem que a degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético pela estirpe *Alcaligenes eutrophus* é mediada por uma dioxigenase cetoglutarato e Ferro (II) dependente. Os ensaios realizados descreveram a capacidade do ácido ascórbico para estimular a actividade dioxigenase, prolongando a actividade da enzima, porém, sem a capacidade de reactivar ou de evitar a inativação enzimática. Já o α -cetoglutarato foi descrito como um co-substrato potencial na degradação do 2,4-D por esta estirpe, estando relacionado com as reacções catalisadas por um grupo de enzimas denominado de α -KG-dependente dioxigenases.

Portanto, a adição de co-substratos pode favorecer a metabolização do xenobiótico, seja pela produção primária das enzimas necessárias para a biodegradação ou pela produção de metabolitos capazes de auxiliar na manutenção enzimática (Janke e Fritsche, 1985).

1.6. Fungos

Os fungos são conhecidos popularmente como mofos e bolores. No entanto, na maior parte das vezes, são lembrados somente pelos danos que algumas espécies causam, seja parasitando plantas ou causando problemas de saúde como alergias e micoses. No entanto, os benefícios proporcionados pelos fungos não são tão comumente divulgados como os prejuízos (Rosa, 2009).

Todos os dias, as pessoas beneficiam de produtos originados directa ou indirectamente por fungos. Pode citar-se como exemplo, a acção fermentativa de fungos na síntese de álcool etílico e dióxido de carbono, os quais são imprescindíveis na produção de bebidas como vinho e cerveja, alimentos como pães e massas entre outros (Rosa, 2009).

Na medicina, os fungos receberam especial atenção a partir do desenvolvimento de alguns antibióticos, destacando-se a penicilina, sintetizada a partir dos metabólitos produzidos pelo *Penicillium chrysogenum*. Os esteróides e hormonas para o crescimento vegetal são oriundos também de metabólitos produzidos por estes microrganismos (Rosa, 2009).

Muitas enzimas fúngicas vêm sendo exploradas na indústria alimentar e em outros processos biotecnológicos envolvidos na fabricação de sucos de frutas. Também a partir de certas espécies de fungos, é possível sintetizar substâncias que actuem como insecticidas auxiliando no controlo de pragas. Nas últimas décadas, os fungos vêm sendo estudados quanto à sua aplicação na recuperação de ambientes contaminados com poluentes químicos (Cox *et al.*, 1998).

Todos os fungos são eucariotas, e podem ser unicelulares ou multicelulares. As células fúngicas agrupam-se em filamentos, podendo apresentar septos entre elas, porém, sem impedir as funções metabólicas entre as células (Cox *et al.*, 1998).

Microrganismos filamentosos como os fungos e muitas actinomicetas, apresentam uma morfologia diversificada e complexa. No contexto industrial, a

produtividade da fermentação depende fortemente da morfologia destes microrganismos, embora nem sempre directamente. Normalmente, estes microrganismos são constituídos por hifas longas em relação à sua largura, que são muitas vezes ramificados.

Cox *et al.* (1998), analisou muitas fermentações industriais que envolviam culturas submersas de fungos e actinomicetas, com a intenção de relacionar a morfologia e a produtividade com as condições do processo. As morfologias encontradas vão desde hifas livremente dispersas até à formação de pellets, um emaranhado de hifas, com aproximadamente um centímetro de diâmetro. As formas dispersas dividem-se em livremente dispersas e agregados (ou “formas agregadas”).

A Figura 1.10 apresenta as formas típicas encontradas em culturas submersas de fungos.

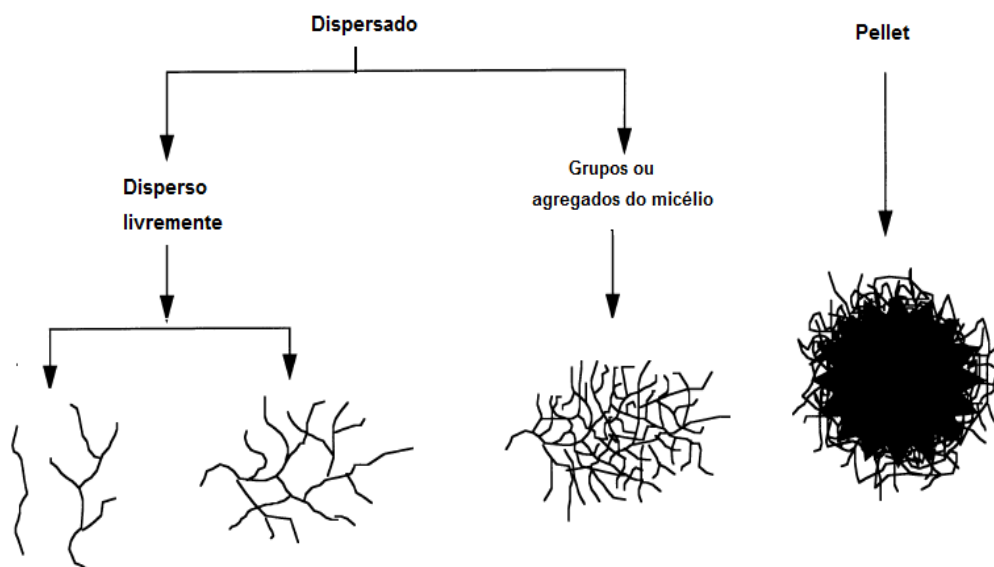


Figura 1.10 - Morfologia das hifas encontradas em culturas submersas de fungos filamentosos e actinomicetas.

Fonte: Adaptado Cox *et al.*, 1998.

1.6.1. Potencial de biorremediação de estirpes de *Penicillium*

Os efeitos da poluição no meio ambiente, especialmente a causada por várias actividades industriais, têm sido responsáveis pela aceleração dos fluxos de matéria orgânica e inorgânica na ecosfera. Xenobióticos, tais como fenóis, compostos fenólicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e metais pesados, mesmo em baixas concentrações, podem ser tóxicos aos seres humanos e outras formas de vida (Leitão, 2009).

Muitas tecnologias de biorremediação tem sido usadas em solos e águas contaminadas, não envolvendo apenas reacções químicas, processos físicos e biológicos, mas envolvendo também a actividade microbiana que é responsável pela remoção e/ou recuperação dos poluentes.

Os fungos estão presentes em sedimentos aquáticos, habitats terrestres e na superfície da água, desempenhando um papel importante na recuperação natural de metais e compostos aromáticos. Os fungos também têm algumas vantagens sobre as bactérias, como a presença de hifas que facilitam a penetração no solo contaminado, atingindo não só os metais pesados, mas também outros xenobióticos (Leitão, 2009).

Apesar da abundância dos fungos na remoção dos resíduos tóxicos, o *Penicillium*, em particular, tem recebido pouca atenção em estudos de biodegradação e biorremediação. Além disso, vários estudos conduzidos com diferentes estirpes de fungos imperfeitos como o *Penicillium* sp., têm demonstrado a sua capacidade de degradar compostos xenobióticos recorrendo a baixas concentrações de co-substratos, sendo potencialmente interessantes para o desenvolvimento de processos economicamente viáveis para a transformação dos poluentes (Leitão, 2009).

Como resultado da adaptação ao seu ambiente, os fungos têm desenvolvido propriedades de biorremediação únicas. Várias estirpes de *Penicillium* demonstraram a capacidade de crescer em ambientes salinos, uma vantagem destes microrganismos sobre os outros no campo da biorremediação. Geralmente, as estirpes de *Penicillium* são microrganismos

halotolerantes, capazes de crescer quer na presença, quer na ausência de sal (Leitão, 2009).

Os resíduos hipersalinos são gerados em diversas actividades industriais, tais como a produção química, petróleo e gás natural, além das práticas de minimização de resíduos. Estes resíduos são constituídos por água e contém elevadas concentrações de sais, óleos, ácidos orgânicos e metais pesados. Portanto, a capacidade halotolerante para remediar poluentes na presença de sal torna-se útil para o tratamento biológico, sem causar danos ao ecossistema (Leitão, 2009).

Durante a última década, os fungos não têm sido apenas utilizados no tratamento de uma ampla variedade de resíduos, bem como foi estabelecido o seu papel na biorremediação de diversos compostos perigosos e tóxicos em solos e sedimentos. Diferentes estirpes de *Penicillium* demonstraram ter a capacidade para a remoção de metais pesados e para degradar, e em alguns casos mineralizar, fenóis, compostos halogenados fenólicos, hidrocarbonetos de petróleo, compostos aromáticos policíclicos, e bifenilos policlorados (Leitão, 2009).

1.6.2. *Penicillium chrysogenum* CLONA2

Leitão *et al.* (2007) isolou uma estirpe de *Penicillium* de uma mina de sal no Algarve, sul de Portugal. A identificação desta estirpe foi feita com base nas características bioquímicas e morfológicas, tendo sido identificada como pertencente ao género *Penicillium* de acordo com Barnett e Hunter (1999) e a espécie *chrysogenum*, conforme descrito por Pitt (1979). A Figura 1.11 mostra uma foto da estrutura micro-morfológica do *P. chrysogenum* CLONA2 ampliada 400 vezes.

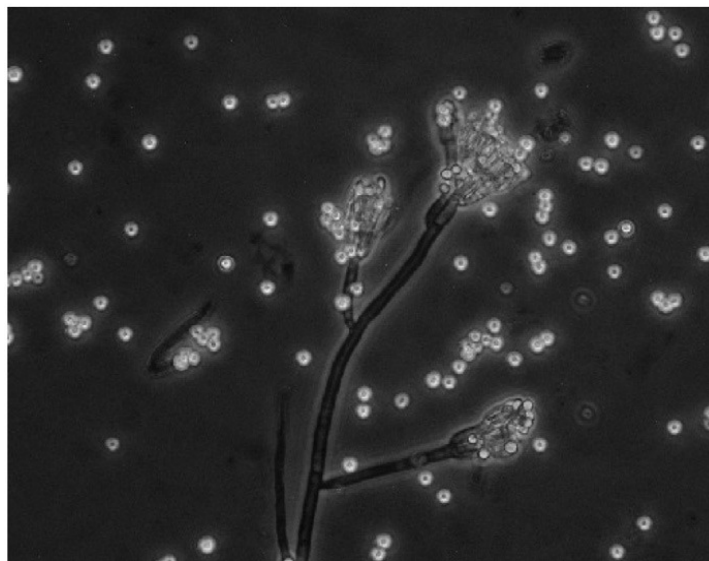


Figura 1.11 - Estrutura micro-morfológica de *P. chrysogenum* CLONA2 ampliado 400 vezes.

Fonte: Leitão *et al.*, 2007.

Ensaio microbiológicos mostraram que a estirpe do *Penicillium chrysogenum* CLONA2 é capaz de crescer na ausência e na presença de sal até concentrações de 5,9% (p/v) de cloreto de sódio (Leitão *et al.*, 2007), sendo designada como um microrganismo halotolerante (Margesin e Schinner, 2001).

Os ensaios realizados em cromatografia líquida de alta eficiência por Leitão *et al.* (2007) mostrou que *P. chrysogenum* CLONA2 foi capaz de degradar o fenol como única fonte de carbono em 5,9% NaCl. Ensaio no Microtox das amostras cultivadas em meio mineral com 300 mg/L de fenol e 5,9% de NaCl mostraram que os metabolitos produzidos durante a degradação do fenol não possuíam toxicidade frente à bactéria designada por *Photobacterium fosforeum*. Com estes resultados obtidos, as possibilidades de utilização desta estirpe no tratamento biológico de efluentes contendo fenol e derivados tornam-se uma abordagem interessante que poderia ser aplicado em vários efluentes (Leitão *et al.*, 2007).

A capacidade demonstrada do *P. chrysogenum* CLONA2 de biorremediar compostos tóxicos com anéis aromáticos, conduziu ao presente estudo, cujo objectivo é verificar a capacidade de degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um herbicida amplamente utilizado na agricultura.

CAPÍTULO II

2. MATERIAL E MÉTODOS

Métodos químicos e microbiológicos foram utilizados para verificar a existência de actividade metabólica de *Penicillium chrysogenum* CLONA2 na presença de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

2.1. Ensaio em meio sólido com diferentes concentrações salinas

Para investigar o efeito conjunto do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e de diferentes concentrações salinas no crescimento do *P. chrysogenum* em meio sólido, foram preparados diferentes meios de cultura constituído por Czapeck Dox Ágar (CDA; Fluka) suplementado com 0%, 2% e 5,9% de cloreto de sódio (FISHER SCIENTIFIC, p.a, Alemanha). Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave (DARLAB, modelo K400) a 121°C durante 21 minutos.

Após arrefecimento em torno de 55 °C-60 °C, dentro da câmara de fluxo laminar STERIL (Modelo VBH), com fluxo vertical constante de 360 mm/h (Figura 2.1), foi adicionado o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (SIGMA D7299, Pureza de 98%, Alemanha) a partir de uma solução stock de 200 mM para a concentração final de 10 mg/L, 100 mg/L, 300 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L. O controlo foi preparado da mesma forma, porém, sem a adição da solução do herbicida. A solução stock do ácido 2,4-diclorofenoxiacético foi preparado a partir de uma partição 75:25 de metanol (FISHER SCIENTIFIC, 99,9%, Alemanha) e água ultra-pura (MiliQ).

Posteriormente, colocou-se 30 mL do meio de cultura em placas de petri estéreis previamente identificadas, deixando-as arrefecer à temperatura ambiente (25 °C) sob condições de esterilidade.



Figura 2.1 - Câmara de fluxo laminar STERIL-VBH, com fluxo vertical constante.

Após solidificação, foi inoculado no centro das placas de petri 0,2 mL de suspensão de conídios (106 esporos/mL) a partir de uma placa incubada durante 72 horas a 25 °C em meio PM1.

Composição do meio PM1:

❖ 5 g/L Bacto-peptona (DIFCO, Estados Unidos); 1 g/L de sólidos de milho; 5 g/L de Lactose monohidratada (HIMEDIA, 99,5%, Índia); 4 g/L de NaCl (FISHER SCIENTIFIC, p.a, Alemanha); 3 mg/L de CuSO_4 anidro (PANREAC, 99%, Espanha); 50 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MERCK, 99,5%, Alemanha); 60 mg/L KH_2PO_4 (BDH LIMITED POOLE, 99%, Inglaterra); 20 g/L Bacto-água (DIFCO, Estados Unidos); pH 7,00.

As placas inoculadas foram incubadas a 25 °C em uma estufa (MEMMERT, Modelo GTR0214) por 168 horas, e os diâmetros das colônias foram medidos, com auxílio de uma régua comum, após 72 horas e, depois disso a cada 24 horas.

A Figura 2.2 apresenta as fotografias do autoclave e da estufa utilizadas nos ensaios.

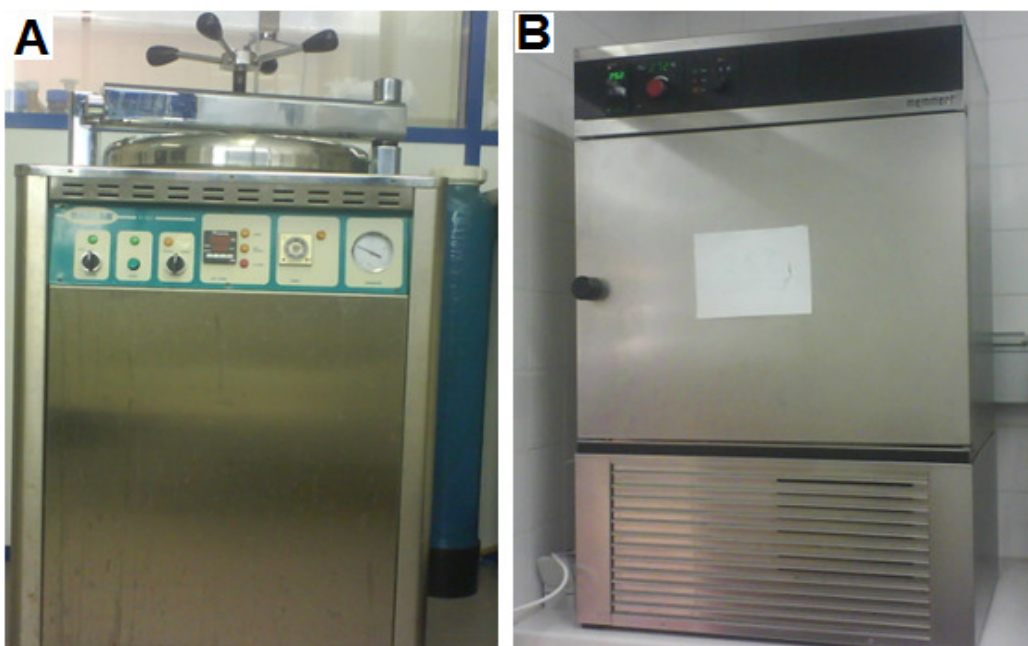


Figura 2.2 - Painei A: Autoclave DARLAB-K400; Painei B: Estufa MEMMERT-GTR0214.

2.2. Ensaio em meio sólido com diferentes fontes de carbono

Para avaliar o efeito de uma fonte de carbono suplementar no crescimento da estirpe de *Penicillium* na presença do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, foram realizados ensaios em meio sólido com a mesma composição do meio Czapeck, com exceção da sacarose. Os meios de cultura foram suplementados, separadamente, com 2% de glicose monohidratada (PANREAC, 99,5%, Espanha), 2% de lactose monohidratada (HIMEDIA, 99,5%, Índia) e 2% de sacarose Extra pura (HIMEDIA, 99,5%, Índia), sendo esterilizado em autoclave a 121°C por 18 minutos.

Composição do meio Czapeck:

❖ 2 g/L de NaNO_3 (RIEDIL-de HAEN, 99% Índia); 0,5 g/L de K_2HPO_4 (BDH CHEMICALS LTDA, pureza de 97,5%, Inglaterra); 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MERCK, 99,5%, Alemanha); 0,01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (RIEDIL-de HAEN, 99%

India); 15 g/L de agar (DIFCO, Estados Unidos) e 20 g/L de NaCl (FISHER SCIENTIFIC, p.a, Alemanha), pH 7,00.

No ensaio que envolvia o estudo sem nenhuma fonte de carbono suplementar não foi adicionado ao meio nenhum dos açúcares descritos acima.

Após o arrefecimento em torno de 55 °C - 60 °C, foi adicionado o 2,4-D a partir de uma solução stock de 200 mM, para a concentração final de: 10 mg/L; 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 300 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L. O controlo foi preparado seguindo a mesma metodologia, porém, sem a adição da solução do herbicida.

Os ensaios prosseguem de forma semelhante ao protocolo descrito na Secção 2.1.

2.3. Ensaio em meio sólido com adição do 2,4-diclorofenol (2,4-DCP)

Foram realizados ensaios com intuito de verificar a influência do 2,4-diclorofenol no crescimento do *Penicillium* em meio sólido, uma vez que a principal via descrita para a degradação do ácido 2,4-diclorfenoxiacético envolve a remoção da cadeia lateral com o resultado da hidroxilação do ácido 2,4-D a 2,4-diclorofenol (Fukumori e Hausinger, 1993a).

Os ensaios foram realizados em meio Czapeck, sem fonte de carbono suplementar, conforme apresentado na Secção 2.2. A adição do 2,4-diclorofenol foi feita a partir de uma solução stock de 200 mM para as respectivas concentrações finais: 1mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 300 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L.

2.4. Taxa de crescimento apical (mm/h)

A taxa de crescimento apical (mm/h) do *P. chrysogenum* foi determinada a partir de uma regressão linear dos diâmetros (mm) em função do tempo (horas) usando o programa Excel 2007 (Ivey *et al.*, 1996).

2.5. Preparação do pré-inóculo

Em todos os ensaios realizados em meio líquido, foi preparado previamente um pré-inóculo a partir da inoculação dos esporos do *Penicillium chrysogenum* CLONA2 cultivado em meio Power, incubado durante 72 horas a 25 °C e conservado a 4 °C até sua utilização.

O meio Power tem como composição:

❖ *Meio PM1*: 5 g/L Bacto-peptona (DIFCO, Estados Unidos); 1 g/L de sólido de milho; 5 g/L de Lactose monohidratada (HIMEDIA, 99,5%, Índia); 4 g/L de NaCl (FISHER SCIENTIFIC, p.a, Alemanha); 3 mg/L de CuSO₄ anidro (PANREAC, 99%, Espanha); 50 mg/L MgSO₄.7H₂O (MERCK, 99,5%, Alemanha); 60 mg/L KH₂PO₄ (BDH LIMITED POOLE, 99%, Inglaterra); 20 g/L Bacto-ágar (DIFCO, Estados Unidos); pH 5,50 ajustado com H₃PO₄ e NaOH.

❖ *Meio Czapeck*: 30 g/L de sacarose extra pura (HIMEDIA, 99,5%, Índia); 2 g/L de NaNO₃ (RIEDIL-de HAEN, 99% Índia); 0,5 g/L de K₂HPO₄ (BDH CHEMICALS LTDA, pureza de 97,5%, Inglaterra); 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O (MERCK, 99,5%, Alemanha); 0,01 g/L FeSO₄.7H₂O (RIEDIL-de HAEN, 99% Índia); 15 g/L de Bacto-ágar (DIFCO, Estados Unidos) pH 7,00

❖ Meio Power provém da adição de 500 mL do meio PM1 e 500 mL do meio Czapeck.

Sob condições estéreis, foi adicionado 1 mL da suspensão de conídios de uma placa de esporos em meio Power, em 100 mL de meio complexo.

Composição do meio complexo (MC): 30 g/L de glicose monohidratada (PANREAC, 99,5%, Espanha); 3 g/L NaNO₃ (RIEDIL-de HAEN, 99% Índia); 0,5

g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MERCK, 99,5%, Alemanha); 10 mg/L $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (RIEDEL-de HAEN, 99%, Alemanha); 1 g/L de K_2HPO_4 (BDH CHEMICALS LTDA, pureza de 97,5%, Inglaterra); 5 g/L de extrato de levedura (DIFCO, Estados Unidos). A adição do cloreto de sódio (NaCl) foi adaptada consoante o ensaio: sem adição para os casos que envolvem 0% de NaCl; 20 g/L para os casos que envolviam 2% e 58,9 g/L para os casos que envolviam 5,9% de NaCl.

O pré-inóculo foi cultivado em condições de aerobiose em uma incubadora CERTOMAT (modelo Sartorius stedim BS-T) a 25 °C e 160 rpm durante 72 horas. Todos os meios e os materiais envolvidos foram previamente esterilizados em autoclave a temperatura de 121 °C durante 21 minutos.

A Figura 2.3 apresenta uma fotografia do incubador CERTOMAT, utilizado nos ensaios.



Figura 2.3 - Incubadora CERTOMAT, modelo Sartorius stedim BS-T, utilizada nos ensaios de cultura submersa.

2.6. Meio de cultura líquido

Foi utilizado o meio mínimo de cultura com ferro (MMFE) em todos os ensaios que envolviam directamente a degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, quer seja os ensaios do Carência Bioquímica de Oxigénio, quer seja nos ensaios em cultura submersa.

O meio MMFE é um meio preparado com minerais isento de fonte de carbono, fornecendo ao microrganismo os minerais necessários para a biodegradação do xenobiótico ao qual este é exposto.

O meio mineral mínimo de cultura tem como composição:

❖ 1 g/L K_2HPO_4 (BDH CHEMICALS LTDA, pureza de 97,5%, Inglaterra); 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$ (MERCK, 99%, Alemanha); 0,2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (MERCK, 99,5%, Alemanha); 0,015 g/L, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (RIEDEL-de HAEN, 99%, Alemanha); 0,1 g/L $CaCl_2$ (MERCK, 99%, Alemanha), com 58,5 g/L de NaCl (FISHER SCIENTIFIC, p.a, Alemanha), excepto nos ensaios realizados com 20 g/L de NaCl ou na ausência de sal, pH 5,70 (Leitão *et al.*, 2007).

A composição dos diferentes meios utilizados nas culturas submersas foi idêntica, excepto: cloreto de sódio (NaCl) em diferentes concentrações, lactose, sacarose e glicose (a 2%); diferentes concentrações de sulfato de manganês monohidratado (MERCK, 99%, Alemanha), 200 μ M de ácido ascórbico (Panreac P.A, 99% de pureza, Espanha), 1 mM do sal de potássio do ácido alfacetoglutarico (Sigma 058K5300, Alemanha) e as diferentes concentrações do herbicida 2,4-D (Sigma D7299, Pureza de 98%, Alemanha).

Todos os meios e os materiais utilizados nos ensaios foram previamente esterelizados em autoclave a 121 °C durante 18 ou 21 minutos, consoante a composição do meio de cultura.

2.7. Ensaio da Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅)

O Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅) é um teste empírico no qual são usados procedimentos laboratoriais padrão para determinar os requisitos relativos a carência de oxigénio das águas poluídas. O teste mede o oxigénio requerido para a degradação bioquímica da matéria orgânica (Standard methods, 1985).

Com base no referido anteriormente, foram realizados testes respirométricos para avaliar o Carência Bioquímica de Oxigénio, e desta forma, analisar a capacidade do microrganismo de mineralizar o herbicida em CO₂.

O método respirométrico DBO Oxitop® foi usado para monitorizar a biodegradação do 2,4-D durante cinco dias. O sistema de medição Oxitop (Oxitop®, WTW, Alemanha) é um aparelho que mede a queda de pressão de uma fase gasosa em um sistema fechado. A fotografia do sistema respirométrico DBO Oxitop encontra-se na Figura 2.4.



Figura 2.4 - Paineis A: Aparelho respirométrico Oxitop; Paineis B: Cabine termostática, regulada para a temperatura de 20 °C ±1°C.

Quando a actividade aeróbia ocorre, o dióxido de carbono é aprisionado numa solução básica e o seu consumo de O_2 está directamente relacionado com a diferença de pressão verificada no sistema.

Todas as experiências foram realizadas em reactores constituídos por garrafas de vidro (510 ml nominal) esterilizadas a 121 °C durante 21 minutos. Após a inoculação do *Penicillium*, foi adicionado três pastilhas de hidróxido de sódio (PANREAC, 98%, Espanha) em cada “headspace”, onde o dióxido de carbono (CO_2) produzido devido a biodegradação do 2,4-D foi capturado. Os reactores foram fechados e mantidos sob agitação em uma cabine termostatzada a 20 °C $\pm 1^\circ C$ durante cinco dias, na ausência de luz. Os resultados foram multiplicados por um factor de 2 de acordo com o fabricante.

A diminuição da pressão na câmara de expansão dentro do reactor foi continuamente e automaticamente registada.

2.7.1. Avaliação do efeito de uma e três lavagens do micélio na preparação do inóculo

Foram realizado alguns ensaios para verificar qual o efeito do número de lavagens do micélio na capacidade de degradação do 2,4-D por *P. chrysogenum*. As lavagens asseguram a eliminação de resquícios das fontes de carbono do pré-inóculo, que podem influenciar directamente os valores obtidos na CBO_5 .

Centrifugou-se aproximadamente 10 mL do pré-inóculo, durante 15 minutos a 4000 rpm em uma centrifuga CENTRONIC (modelo S-577) em condições de refrigeração.

Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado sendo adicionado 10 mL de uma solução de cloreto de sódio 0,85% (p/v), para manutenção da pressão osmótica, nos tubos que continham as células. Posteriormente, os tubos foram novamente centrifugados durante 15 minutos a 4000 rpm. Para o teste que avaliava o efeito após 3 lavagens do micélio, as células foram

lavadas com NaCl mais duas vezes, num total de três lavagens, seguindo os passos descritos anteriormente.

A seguir à lavagem das células, os volumes foram aferidos até 10 mL com meio mínimo MMFE, previamente preparado e esterelizado, sendo pipetado 4 mL do inóculo para cada garrafa de vidro, com o auxílio de uma micropipeta (marca GILSON, França)

Na sequência, acrescentou-se 361 mL do meio MMFE (2% de NaCl), perfazendo um total de 365 mL. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético foi adicionado a partir de uma solução stock de 200 mM para uma concentração final de 40 mg/L. A solução de manganês foi adicionada para uma concentração final de 0,29 μ M, 0,59 μ M e 1,18 μ M a partir de uma solução stock de 9 μ M.

Após a inoculação, o reactor foi fechado e incubado a 20 ± 1 °C durante cinco dias na ausência de luz. Um esquema para exemplificar a metodologia descrita encontra-se apresentado na Figura 2.5.

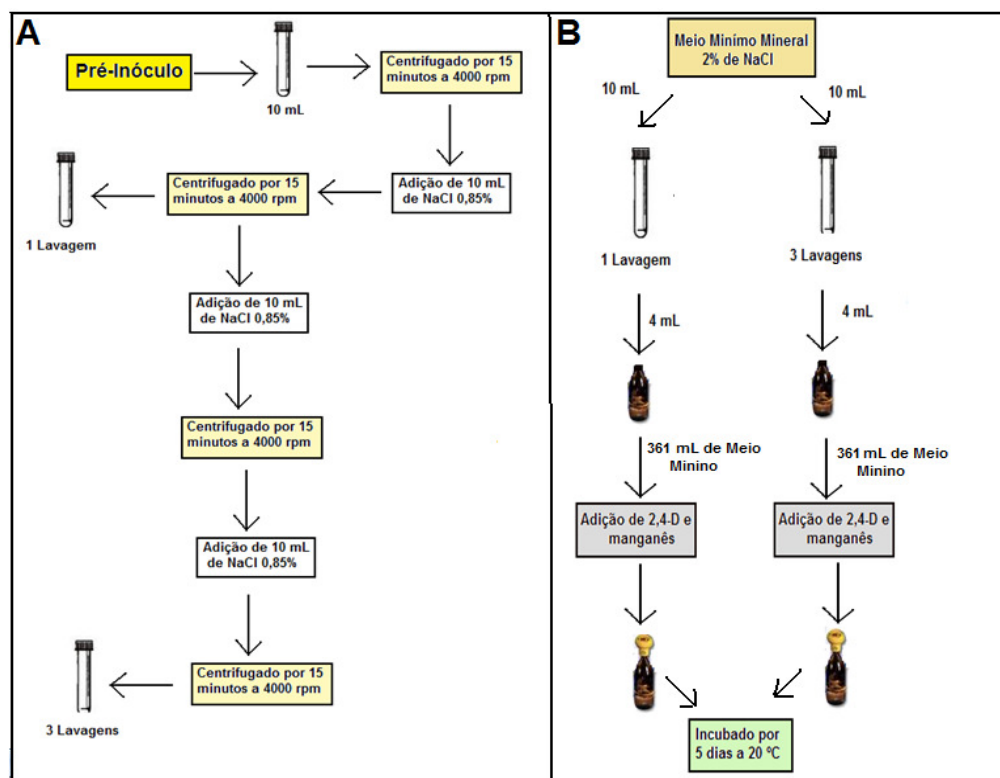


Figura 2.5 - Esquema da preparação dos ensaios de CBO₅. Painei A: lavagens; Painei B: Inoculação.

2.7.2. Influência da adição de diferentes co-substratos

De modo a estudar a influência de α -cetoglutarato, ácido ascórbico e manganês (Mn) em cultura de *Penicillium* na presença de 40 mg/L do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, foi utilizado o método descrito com três lavagens das células e o procedimento de inoculação neste ensaio respirométrico foi semelhante ao ensaio apresentado na Seção 2.6.1, com exceção da adição dos diferentes co-substratos: manganês, ácido ascórbico e α -cetoglutarato a fim de atingir uma concentração final de 1,18 μ M, 200 μ M e 1 mM, respectivamente.

2.8. Comparação da eficiência de degradação do herbicida pelo *Penicillium* face a diferentes concentrações salinas em cultura submersa.

O *Penicillium chrysogenum* CLONA2 foi descrito como sendo um microrganismo halotolerante, podendo crescer quer na ausência, quer na presença de 5,9% de NaCl (Leitão et al, 2007). Atendendo ao exposto, foram realizados vários ensaios em cultura líquida com o *Penicillium* em meio mínimo mineral com diferentes concentrações salinas na presença 2,4-D para avaliar a influência do sal na biodegradação do herbicida.

O pré-inóculo utilizado para estes ensaios foi preparado com as respectivas concentrações salinas: 0%, 2% e 5,9% de NaCl (p/v). Ao fim das 72 horas de incubação do pré-inóculo em meio complexo, foi centrifugado 10 mL durante 15 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado, sendo acrescentado 10 mL de uma solução estéril de 0,85% NaCl (p/v) para a lavagem das células e centrifugado por mais 15 minutos a 4000 rpm.

No final da lavagem das células, o sobrenadante foi descartado, sendo o volume aferido para 10 mL com o meio mínimo mineral preparado com as respectivas concentrações salinas 0%, 2% e 5,9% de NaCl (p/v). As fermentações foram realizadas em erlenmeyeres de 250 mL com um volume final de 50 mL com 50 mg/L do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e 1,18 μ M de

manganês. Posteriormente os erlenmeyeres foram incubados a 25 °C e 160 rpm.

Foram retirados dois erlenmeyeres dos respectivos ensaios (0%, 2% e 5,9% de NaCl) após 72 horas para analisar a concentração de 2,4-D por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

2.9. Fermentação em cultura submersa: efeito combinado de diferentes concentrações salinas com a adição conjunta do manganês, ácido ascórbico e ácido acetoglutárico na degradação do herbicida.

Para comparar a influência dos co-substratos na degradação do 2,4-D em diferentes concentrações salinas, foi realizado um ensaio conforme apresentado na Seção 2.8, com a modificação da adição simultânea de 1,18 µM de manganês, 200 µM de ácido ascórbico e 1 mM α-cetoglutarato na presença de 50 mg/L de 2,4-D.

2.10. Fermentação em cultura submersa: efeito da adição de um açúcar como fonte de carbono suplementar na degradação do herbicida.

Foram realizados ensaios em cultura submersa em meio mínimo mineral com diferentes açúcares como fonte de carbono suplementar para averiguar a influência na biodegradação do 2,4-D pelo *Penicillium*. As fontes de carbono escolhidas para o ensaio foram a sacarose, lactose e glicose.

Preparou-se previamente o meio mínimo mineral com 2% de NaCl, sendo acrescentado, separadamente, 2% de sacarose, 2% de glicose e 2% de lactose (p/v).

O pré-inóculo foi preparado em meio complexo com 2% de NaCl. Após as 72 horas de incubação as células foram recolhidas e lavadas com uma solução de 0,85% de NaCl (p/v). Posteriormente o sobrenadante foi descartado, sendo

o volume aferido para 10 mL com meio MMFE com 2% de NaCl e as respectivas fontes de carbono suplementares.

Em cada erlenmeyer, foi adicionado 40 mL do meio MMFE com 2% de NaCl, 10 mL do inóculo e 100 mg/L de 2,4-D. Os erlenmeyeres foram cultivados de forma aeróbia em uma incubadora a 25 °C e 160 rpm. Foram retiradas duas amostras diárias para análise por HPLC até a observação de lise celular.

2.11. Fermentação em cultura submersa: Comparação da degradação do 2,4-D face à adição de diferentes co-substratos

Foram realizados ensaios em cultura submersa em meio mínimo alternativo com 2% de NaCl, com a adição de ácido ascórbico, α -cetoglutarato e manganês como co-substratos para analisar a influência na biodegradação do 2,4-D.

Os ensaios prosseguiram de forma semelhante ao protocolo descrito na Secção 2.10, com excepção dos açúcares e com o acréscimo, separado, das soluções de 2,4-D, manganês, α -cetoglutarato e ácido ascórbico para concentração final de 40 mg/L, 1,18 μ M, 1 mM e 200 μ M, respectivamente.

2.12. Fermentação em cultura submersa: biodegradação do 2,4-D na presença de α -cetoglutarato em meio com diferentes valores do pH inicial: pH de 5,70, pH de 7,00 e pH tamponado a 6,50.

Nos ensaios para otimizar a biodegradação do 2,4-D foram testados diferentes pH inicial do meio mínimo mineral com a presença do co-substrato α -cetoglutarato.

No ensaio com pH 7,0 foi preparado meio mínimo mineral com 2% de NaCl, sendo ajustado o pH para 7,00. Já nos ensaios com a adição do tampão pH 6,50, foram adicionados ao meio MMFE 8 g/L de NaH_2PO_4 (MERCK, 99%,

Alemanha) e 9,47 g/L de Na_2HPO_4 (MERCK, 99%, Alemanha) para uma partição final de 80:20 respectivamente (Thompson, 2004). Os meios foram previamente esterelizados a temperatura de 121 °C durante 21 minutos.

O procedimento de preparação do inóculo foi semelhante ao descrito na Secção 2.8.

Colocou-se 10 mL do inóculo e 40 mL dos respectivos meios MMFE em erlenmeyers estéreis de 250 mL de capacidade. Posteriormente foi adicionado 40 mg/L de 2,4-D e 1 mM do α -cetoglutarato.

As culturas foram incubadas em condições aeróbias durante 48 horas a 25 °C e a 160 rpm. Foram retiradas duas amostras de hora a hora até às 10 horas de cultura, e às 15, 22, 27, 31, 36 e 48 hrs de incubação para análise no HPLC, determinação do pH e biomassa.

2.13. Determinação do pH

O pH dos sobrenadantes foi determinado através de um eléctrodo de pH CRISON (Modelo MicropH2001) com o intuito de seguir a variação do pH durante a biodegradação do 2,4-D.

A fotografia do electrodo de pH encontra-se apresentada na Figura 2.6.

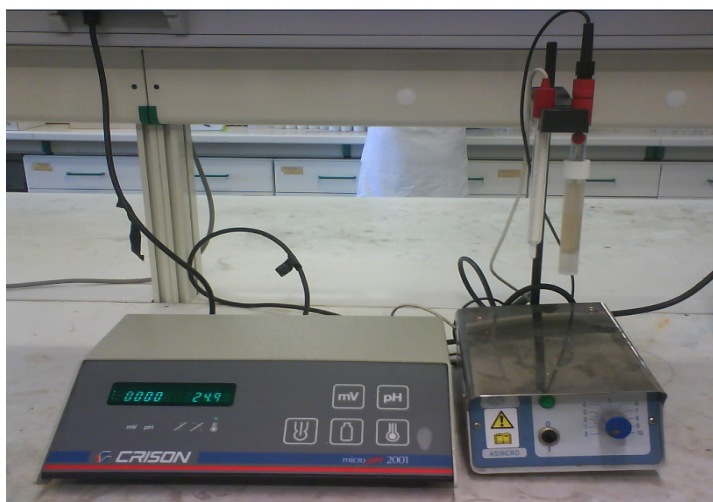


Figura 2.6 - Electrodo de pH CRISON (Modelo MicropH2001).

2.14. Estimativa da biomassa

A biomassa microbiana foi estimada pelo método gravimétrico. As amostras foram filtradas com filtro SCHLEICHER e SCHUELL (modelo MicroScience GmbH595, Alemanha), e o filtrado foi recolhido para análise do pH. Posteriormente o pellet foi seco em estufa MEMMERT (sem definição do modelo) a 90 °C durante 24 horas, arrefecido durante 24 horas e, portanto, pesados em uma balança DENVER INSTRUMENT COMPANY (modelo TR-204).

A Figura 2.7 apresenta as fotografias da estufa e da balança utilizadas para a determinação da biomassa.

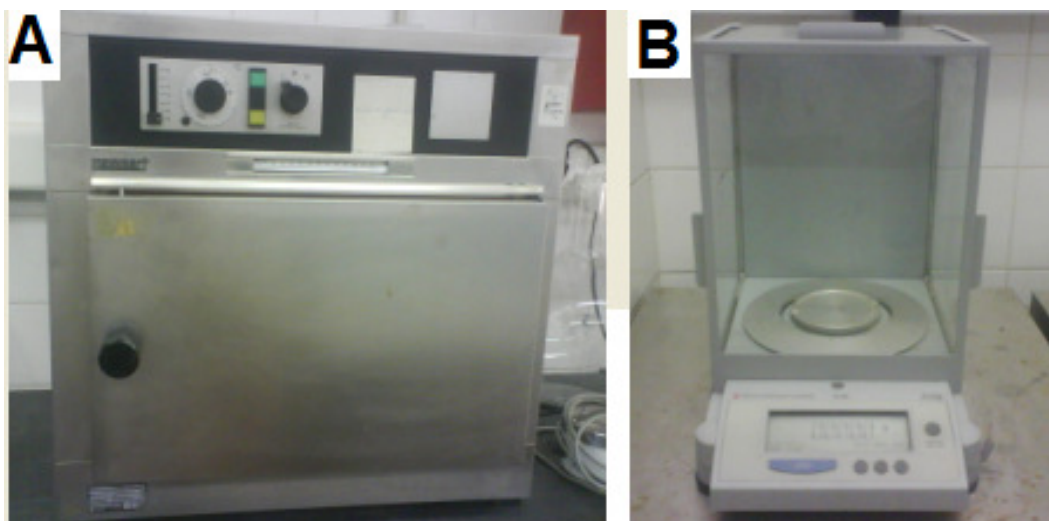


Figura 2.7 - Painel A: Estufa MEMMERT; Painel B: Balança DENVER INSTRUMENT COMPANY (modelo TR-204).

2.15. Determinação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método físico-químico de separação no qual os constituintes da amostra são particionados entre duas fases, uma estacionária e a outra numa fase móvel que percola através da primeira. A fase estacionária empregada pode ser um sólido ou um líquido, enquanto que a fase móvel pode

ser um fluido líquido ou um gás. Após transitar pela fase estacionária, por um percurso de distância adequadamente escolhido, os componentes da amostra separam-se, sendo monitorizados pelo detector: desde o componente menos retido ao último componente retido pela fase estacionária (Collins *et al.*, 1993).

A cromatografia líquida de alta eficiência é efectuada através da injeção de uma pequena quantidade de amostra líquida no fluxo da fase móvel, que passa através de uma coluna contendo partículas sólidas inertes de reduzidas dimensões (fase estacionária) devido à velocidade uniforme e à pressão elevada que pode ir desde os 500 aos 5000 psi (Skoog *et al.*, 1996).

A separação dos diversos componentes que constituem a amostra depende dos diferentes graus de retenção de cada um desses componentes na coluna. O factor de capacidade de cada componente da amostra que é retido na coluna é definido pela razão entre o tempo de permanência do soluto na fase estacionária e o tempo da sua permanência na fase móvel (Skoog *et al.*, 1996)

Após a análise da amostra através da técnica de HPLC, obtém-se um cromatograma que consiste num gráfico que exhibe a resposta do detector em função do tempo de eluição. Cada um dos componentes que constituem a amostra analisada pode ser identificado qualitativamente através do tempo de retenção (T_R) que corresponde ao tempo de permanência na fase estacionária. A identificação qualitativa é obtida por comparação entre o valor de T_R do componente em análise e o respectivo T_R de padrões previamente analisados (Skoog *et al.*, 1996).

A área obtida em cada pico no cromatograma é proporcional à concentração do componente na amostra original em análise. Se os picos obtidos forem bem definidos e a velocidade do fluxo for cuidadosamente controlada, a área do pico é proporcional à concentração do componente em estudo. Desta forma, deve-se determinar previamente uma recta de calibração, traçando uma representação gráfica da área dos picos em função da concentração de uma série de padrões analisados (Skoog *et al.*, 1996).

A Figura 2.8 apresenta uma fotografia do HPLC utilizado nas análises do herbicida 2,4-D.



Figura 2.8 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) MERCK HITACHI, Modelo Lachrom (Interface D-7000, Detector UV L7400 e Bomba L-7100).

2.15.1. Condições cromatográficas para análise

Preparou-se previamente uma solução tampão pH 4,00 com 6 g/L de K_2HPO_4 (BDH CHEMICALS LTDA, pureza de 97,5%, Inglaterra) e 3 mL/L de H_3PO_4 (FISHER SCIENTIFIC, pureza de 86,1%, Alemanha), aferido o pH para 4,00. A solução tampão foi filtrada duas vezes em filtro de membrana celulósica (WHATMAN, referência nº 10407312, Alemanha) com poros de 45 μm e degaseificado no banho de ultra-som (SELECTA, modelo N631 1/3) durante 25 minutos (Thompson, 2004). O tempo máximo da função tamponante detectada foi de 48 horas.

Foram utilizados dois métodos para a análise cromatográfica do 2,4-D, um método com gradiente e um método isocrático. A fase móvel para os dois métodos foi constituída pela solução tampão pH 4,00 e acetonitrilo (LAB-SCAN, 99,9%, Irlanda) em diferentes partições.

As condições do equipamento utilizadas para as análises cromatográficas, quer seja com o método gradiente quer seja com o método isocrático, encontram-se identificadas no Quadro 2.1.

Quadro 2.1 - Condições cromatográficas utilizadas nas análises do 2,4-D.

Condições cromatográficas utilizadas					
Fase móvel	Solução	tampão	pH	4,00	e
	acetonitrilo				
Tamanho da coluna	4,6 mm X 250 mm				
Diamêtro das partículas da coluna	5,0 µm ODS2				
Temperatura	Ambiente				
Caudal	1 mL/min				
Volume de amostra	20 µL				
Detector	L-7400				
Comprimento de onda	230 nm				

Para as análises realizadas com o método gradiente foi utilizado um aumento crescente da solução de acetonitrilo, conforme apresentado no Quadro 2.2. As análises neste método permitiram verificar a presença do pico cromatográfico correspondente ao 2,4-diclorofenol bem como os picos intermediários existentes que caracterizam a biodegradação do herbicida em estudo.

Quadro 2.2 - Partição da fase móvel utilizada nas análises do 2,4-D pelo método cromatográfico gradiente. Tempo de corrida de 20 minutos.

Tempo (minutos)	Tampão pH 4,00 (%)	Acetonitrilo (%)
0	70	30
6,0	60	40
12	50	50

Já para amostras analisadas com o método isocrático, foi utilizado uma partição 70:30 de solução tampão pH 4,00 e acetonitrilo, com um tempo de corrida de 12 minutos.

2.15.2. Recta de calibração

Para se obter a curva de calibração do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, traçou-se um gráfico tendo por base os valores obtidos da análise de padrões (valores em duplicado individuais presentes no anexo III), cujos dados relativos às suas concentrações e área do pico obtida estão descritos no Quadro 2.3.

Quadro 2.3 - Dados obtidos na preparação da recta de calibração do 2,4-D

Concentração dos padrões de 2,4-D (mg/L)	Área do pico (Média)
5	141171,00 ± 49,50
20	549666,00 ± 10237,49
30	851171,00 ± 2405,58
40	1263063,50 ± 2870,15
50	1518681,50 ± 4114,65
60	1828284,50 ± 1270,67
75	2469079,50 ± 14886,72
90	2947545,50 ± 75386,60
100	3198097,50 ± 17296,54
120	3796397,50 ± 46978,76

Com os resultados do Quadro 2.3, construiu-se um gráfico através da regressão linear, com auxílio do programa excel. O gráfico obtido encontra-se na Figura 2.9.

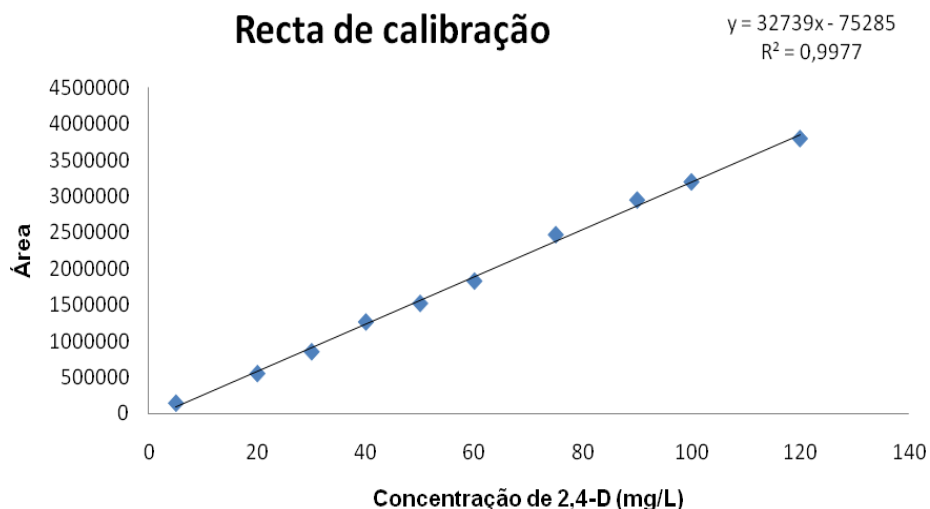


Figura 2.9 - Recta de calibração para análise cromatográfica do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, programa Excel 2007.

Por regressão linear obteve-se a equação da recta **$y = 32739x - 75285$** que define a recta de calibração para o ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Foi realizado duas rectas de calibrações: uma com o método gradiente e outra com o método isocrático. Como não foi observado diferença significativa entre ambas, optou-se pela utilização da recta de calibração realizada pelo método isocrático para a quantificação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

CAPÍTULO III

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3.1. Crescimento em meio sólido face a diferentes concentrações salinas

A estirpe do *Penicillium* foi previamente isolada a partir de uma mina de sal no Sul de Portugal. Com base na halotolerância apresentada do *P. chrysogenum* CLONA2, foi investigado o efeito combinado do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) com diferentes concentrações salinas no seu crescimento em meio sólido.

Os resultados individuais obtidos e as equações da recta utilizadas para o cálculo da taxa de crescimento apical encontram-se presentes no anexo IV e V, respectivamente. O Quadro 3.1 apresenta a média do crescimento apical em mm de *Penicillium* durante 168 horas de incubação a 25 °C com diferentes concentrações salinas de cloreto de sódio (NaCl).

Quadro 3.1 - Média do crescimento apical do *Penicillium* em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) combinado com diferentes concentrações de 2.4 D.

Concentração 2,4-D	72 Horas		96 Horas		120 Horas		144 Horas		168 Horas	
	NaCl (%)	CA* (mm)	NaCl (%)	CA* (mm)	NaCl (%)	CA* (mm)	NaCl (%)	CA* (mm)	NaCl (%)	CA* (mm)
Control	0	15,3 ± 0,3	0	20,5 ± 0,2	0	25,3 ± 0,4	0	31,6 ± 0,8	0	37,1 ± 0,6
	2	18,7 ± 0,3	2	26,9 ± 0,3	2	35,3 ± 0,5	2	42,4 ± 0,5	2	50,2 ± 0,6
	5,9	14,1 ± 0,6	5,9	19,8 ± 0,6	5,9	25,1 ± 0,6	5,9	33,1 ± 0,4	5,9	38,8 ± 0,7
10 mg/L	0	15,3 ± 0,4	0	19,8 ± 0,9	0	25,1 ± 0,2	0	31,1 ± 0,3	0	37,3 ± 0,3
	2	17,7 ± 0,5	2	25,5 ± 0,7	2	33,9 ± 0,5	2	40,9 ± 0,8	2	48,8 ± 0,4
	5,9	13,8 ± 0,9	5,9	19,6 ± 0,9	5,9	24,8 ± 0,5	5,9	32,8 ± 0,6	5,9	38,8 ± 0,7
100 mg/L	0	14,1 ± 0,3	0	19,6 ± 0,3	0	24,6 ± 0,5	0	31,3 ± 0,4	0	37,3 ± 0,2
	2	18,1 ± 0,4	2	25,9 ± 0,7	2	34,8 ± 1,0	2	41,2 ± 1,0	2	47,8 ± 0,5
	5,9	13,8 ± 0,3	5,9	19,8 ± 1,0	5,9	24,3 ± 0,7	5,9	33,0 ± 1,0	5,9	38,8 ± 0,2
300 mg/L	0	13,3 ± 0,7	0	18,0 ± 0,8	0	23,5 ± 0,5	0	29,6 ± 0,5	0	32,5 ± 1,0
	2	16,1 ± 0,5	2	23,3 ± 0,6	2	31,5 ± 0,5	2	37,7 ± 0,7	2	46,2 ± 0,4
	5,9	12,8 ± 0,5	5,9	18,3 ± 0,6	5,9	23,3 ± 0,7	5,9	31,1 ± 0,6	5,9	37,3 ± 0,5
500 mg/L	0	13,1 ± 0,4	0	17,5 ± 0,5	0	21,8 ± 0,4	0	27,1 ± 0,7	0	30,0 ± 0,7
	2	14,6 ± 0,5	2	21,0 ± 0,5	2	27,3 ± 0,8	2	34,3 ± 1,0	2	41,4 ± 0,6
	5,9	10,3 ± 0,8	5,9	15,0 ± 0,4	5,9	19,0 ± 0,5	5,9	24,8 ± 0,4	5,9	30,5 ± 0,6
1000 mg/L	0	7,30 ± 1,0	0	10,1 ± 0,7	0	14,6 ± 0,4	0	23,8 ± 0,4	0	25,1 ± 0,4
	2	8,88 ± 0,4	2	14,1 ± 0,8	2	18,1 ± 0,5	2	23,1 ± 1,1	2	29,5 ± 0,7
	5,9	6,00 ± 0,6	5,9	9,00 ± 0,5	5,9	12,8 ± 0,7	5,9	17,8 ± 0,5	5,9	22,3 ± 0,8

*CA: Crescimento apical

A taxa de crescimento apical (mm/h) do *P. chrysogenum* foi determinada por uma regressão linear dos diâmetros (mm) em função do tempo (horas) usando o programa excel. Os resultados da taxa de crescimento apical encontram-se no gráfico apresentado na Figura 3.1.

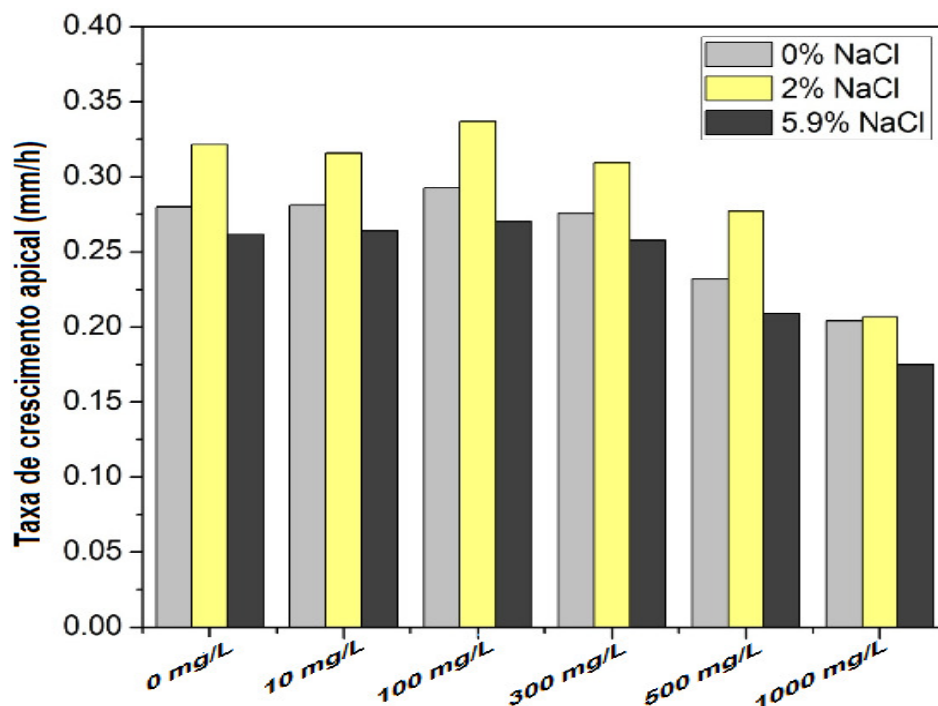


Figura 3.1 - Comparação das taxas de crescimento apical do *P. chrysogenum* CLONA2 entre diferentes condições salinas e diferentes concentrações de 2,4-D em meio CDA. O diâmetros das colónias foram determinados tomando como referência a borda externa branca das colónias durante 7 dias a 25 °C.

Como pode ser observado na Figura 3.1, o microrganismo apresentou maior crescimento nos ensaios com 2% NaCl, sendo superior em todas as concentrações de 2,4-D ensaiadas, com excepção da concentração de 1000 mg/L, cujo resultado foi semelhante ao de 0% de NaCl.

Estes resultados demonstram a capacidade do *P. chrysogenum* de crescer em presença de um herbicida, observou-se, contudo, uma maior inibição em concentrações salinas elevadas. No entanto, o microrganismo apresentou capacidade para crescer em presença de dois factores negativos ao seu crescimento: elevadas concentrações salinas e toxicidade do 2,4-D.

Apesar das diferenças no desenvolvimento microbiano entre o meio sólido e o meio líquido, a concentração salina de 2% de NaCl foi a óptima para qualquer uma das condições. Deste modo, seleccionou-se a concentração salina de 2% para os testes seguintes em meio sólido.

3.2. Crescimento em meio sólido face a diferentes fontes de carbono

A adição de minerais ou de fontes de carbono tem sido utilizada para aumentar a taxa ou o grau de degradação de xenobióticos, incluindo bifenilos policlorados (Bedard e Haberl, 1990) e pesticidas como piretróides sintéticos (Grant e Betts, 2001) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Papanastasiou e Maier, 1982).

Há evidências que, se o xenobiótico presente não foi suficiente para activar a produção de enzimas, então a sua degradação pode, por vezes, ser auxiliada por processos de co-metabolismo (Limbert e Betts, 1994). A degradação do xenobiótico é então, aumentada na presença de outro substrato (Harder e Dijkhuizen 1982), onde o microrganismo opta pelo uso do substrato complementar como fonte de energia até à adaptação enzimática necessária para a transformação e degradação do tóxico presente (Dalton e Stirling, 1982).

Grant e Betts (2001) mostraram que o uso de um açúcar como fonte de carbono suplementar favoreceu os mecanismos de degradação necessários para a desintoxicação de piretróides sintéticos por *Pseudomonas* sp. Atendendo ao exposto, foram realizados vários ensaios de modo a investigar o comportamento do *P. chrysogenum* na presença do ácido 2,4-diclorofenoxiacético combinado com outras fontes de carbono em meio sólido com 2% de NaCl, concentração salina considerada óptima de acordo com os ensaios apresentados na Secção 3.1.

Os ensaios foram realizados em meio sólido sem a suplementação de açúcares e com a suplementação de três fontes de carbono na presença de diferentes concentrações de 2,4-D: glicose, sacarose e lactose.

Os resultados individuais dos ensaios apresentados na Secções seguintes encontram-se presentes no anexo VI e a recta de regressão Linear utilizadas nos cálculos da taxa de crescimento apical (mm/h) encontram-se no anexo VII.

3.2.1. Meio sólido sem suplementação de açúcar

Para a realização dos ensaios em meio sólido sem a suplementação de açúcar, preparou-se o meio sólido com a composição idêntica ao meio Czapeck, excepto a sacarose. Deste modo, a adição de 2,4-D representou a única fonte de carbono disponível no meio sólido, permitindo avaliar o efeito do herbicida no crescimento apical do *P. chrysogenum* CLONA2.

O Quadro 3.2 apresenta a média do crescimento apical (mm) em diferentes concentrações de 2,4-D como única fonte de carbono.

Quadro 3.2 - Média do crescimento apical do *Penicillium* em meio sólido na presença do 2,4-D como única fonte de carbono.

Amostras	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Control	11,1 \pm 0,6	15,8 \pm 0,6	21,0 \pm 0,7	26,6 \pm 0,4	33,5 \pm 0,4
10 mg/L	10,0 \pm 0,3	15,3 \pm 0,4	20,3 \pm 0,6	25,0 \pm 0,7	31,5 \pm 0,4
25 mg/L	10,8 \pm 0,7	16,0 \pm 1,0	21,0 \pm 0,7	26,6 \pm 0,9	33,5 \pm 0,9
50 mg/L	9,5 \pm 0,4	15,5 \pm 0,6	20,0 \pm 0,7	25,6 \pm 0,5	32,6 \pm 0,6
100 mg/L	9,2 \pm 0,4	14,5 \pm 0,4	19,6 \pm 0,4	25,6 \pm 0,9	32,0 \pm 0,6
300 mg/L	9,0 \pm 0,7	13,6 \pm 0,2	18,0 \pm 0,7	23,3 \pm 0,7	29,5 \pm 0,7
500 mg/L	8,0 \pm 0,50	12,1 \pm 0,9	16,3 \pm 0,6	21,6 \pm 1,0	28,0 \pm 1,0
1000 mg/L	*N.C	*N.C	*N.C	*N.C	*N.C

* **N.C:** Não apresentou crescimento

Como pode ser observado nos dados presentes no Quadro 3.2, o microrganismo foi capaz de crescer em concentrações de até 500 mg/L do herbicida, contudo, não foi observado crescimento em concentrações de 1000

mg/L. Desta forma, a estirpe do *Penicillium* em estudo tem a capacidade de tolerar concentrações até 500 mg/L com o 2,4-D como única fonte de carbono em meio sólido.

Em análise à Figura 3.2, foi observado uma inibição de aproximadamente 5% da taxa de crescimento apical (mm/h) nas amostras que continham 10 mg/L de 2,4-D. Quando a concentração foi elevada para 25 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L, a velocidade de crescimento das hifas foi semelhante ao controle, não apresentando diferença significativa. Entretanto, nas concentrações de 300 mg/L e 500 mg/L foi observado uma inibição de 8% e 10%, respectivamente. Já em concentrações de 1000 mg/L, houve uma inibição de 100% no crescimento do fungo, demonstrando a toxicidade do 2,4-D para o *Penicillium* a concentrações elevadas do herbicida.

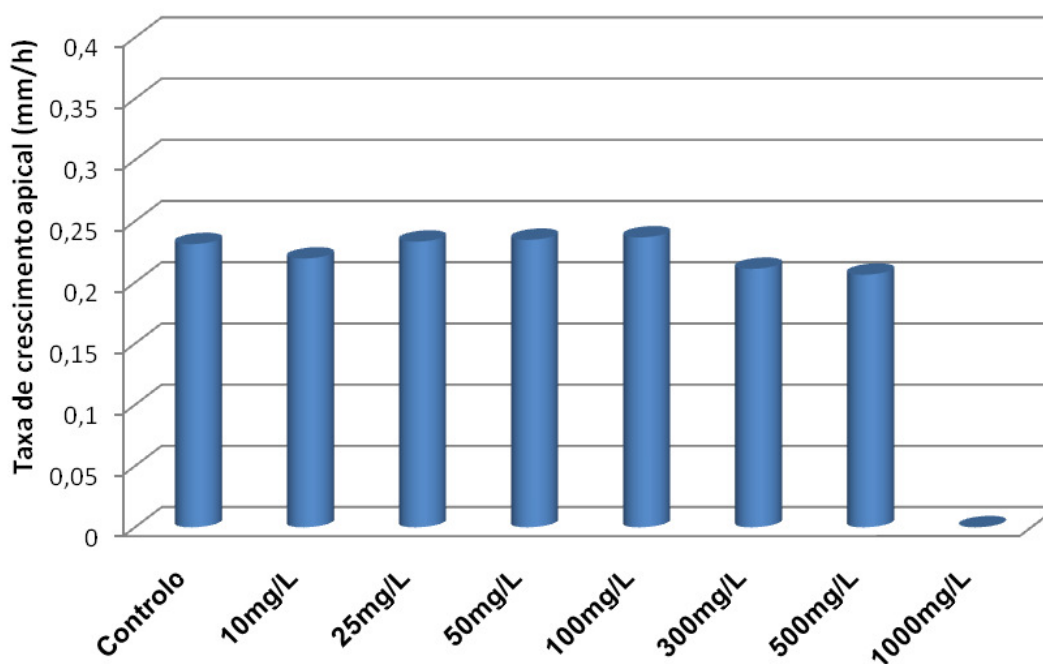


Figura 3.2 - Taxa de crescimento apical do *P. chrysogenum* CLONA2 entre diferentes concentrações de 2,4-D em meio czapeck sem outra fonte de carbono. Os diâmetros das colônias foram determinados tendo como referência a borda externa branca das colônias durante 7 dias a 25 °C. O controle é referente ao mesmo meio utilizado com exceção da adição do herbicida.

Pode-se dizer que em meio sólido, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético não estimula o crescimento do *P. chrysogenum* como fonte de carbono, visto que o

crescimento foi semelhante ao controlo, porém, foi possível observar que em concentrações de até 500 mg/L o microrganismo apresenta resistência ao herbicida.

3.2.2. Meio sólido suplementado com 2% de glicose

Para avaliar o efeito da glicose como fonte de carbono suplementar, foram usadas diferentes concentrações de 2,4-D com 2% de glicose e 2% de NaCl em meio sólido.

O Quadro 3.3 apresenta a média do crescimento apical (mm) do *P. chrysogenum* em presença de duas fontes de carbono (2,4-D e glicose).

Quadro 3.3 – Média do crescimento apical (mm) do *Penicillium* em meio sólido na presença de 2,4-D com 2% de glicose.

Amostras	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Control	15,0 \pm 0,5	20,8 \pm 0,5	38,3 \pm 0,4	42,3 \pm 0,6	48,0 \pm 0,6
10 mg/L	16,1 \pm 0,4	21,0 \pm 1,3	39,0 \pm 0,7	43,1 \pm 0,7	48,6 \pm 0,8
25 mg/L	15,0 \pm 1,0	20,3 \pm 0,8	37,5 \pm 0,5	41,5 \pm 1,0	46,6 \pm 1,0
50 mg/L	13,8 \pm 0,6	18,0 \pm 0,9	35,7 \pm 0,8	39,5 \pm 1,5	44,5 \pm 1,1
100 mg/L	14,0 \pm 0,7	19,1 \pm 0,7	36,3 \pm 1,0	39,0 \pm 1,0	44,3 \pm 0,7
300 mg/L	13,0 \pm 0,5	18,0 \pm 0,7	24,0 \pm 1,1	37,6 \pm 0,4	42,3 \pm 0,5
500 mg/L	*N.C	*N.C	*N.C	*N.C	*N.C
1000 mg/L	*N.C	*N.C	*N.C	*N.C	*N.C

* **N.C:** Não apresentou crescimento.

O *P. chrysogenum* apresentou crescimento em concentrações de até 300 mg/L, sendo totalmente inibido em concentrações mais elevadas. A adição da glicose como fonte suplementar inibiu o crescimento do microrganismo para concentrações de 500 mg/L de 2,4-D, facto que não foi observado quando foi exposto ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético como única fonte de carbono.

Os resultados da taxa de crescimento apical (TCA) encontram-se apresentados na Figura 3.3.

A concentração de 10 mg/L não interferiu no crescimento do *Penicillium*, quer de forma positiva, quer de forma negativa. Já quando a concentração de 2,4-D foi aumentada, observou-se um crescimento inferior das hifas, em relação ao controlo, de aproximadamente 3,5% para 25 mg/L, 5% para 50 mg/L, 9% para 100 mg/L e 10,5% para 300 mg/L. A suplementação da glicose favoreceu a inibição total do crescimento do microrganismo na presença de concentrações de 500 mg/L e 1000 mg/L do xenobiótico em estudo.

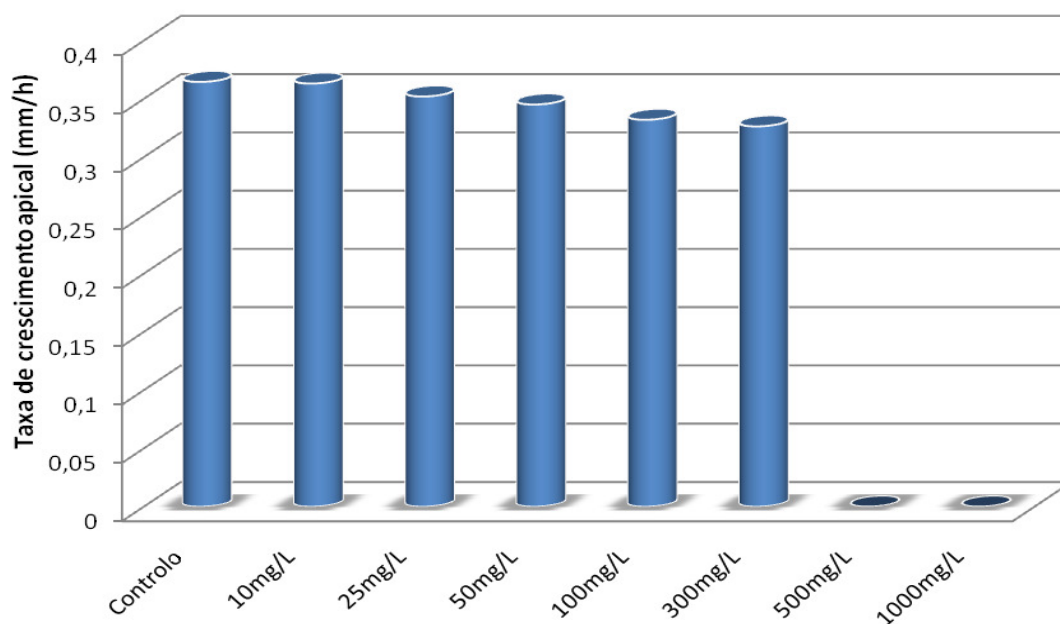


Figura 3.3 - Taxa de crescimento apical do *P. chrysogenum* CLONA2 a diferentes concentrações de 2,4-D em meio czapeck, sem sacarose e suplementado com 2% de glicose. Os diâmetros das colónias foram determinados tendo como referência a borda externa branca das colónias durante 7 dias a 25 ° C. O controlo é composto pelo mesmo meio utilizado, sem a adição do 2,4-D.

Como pode ser observado na Figura 3.4, os esporos produzidos pelo *P. chrysogenum* CLONA2 em meio com glicose, eram de cor branca e sem a produção de pigmentos na parte superior. Estas características foram detectadas em todas as placas, incluindo o controlo, indicando que este comportamento é devido à presença da glicose e não do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

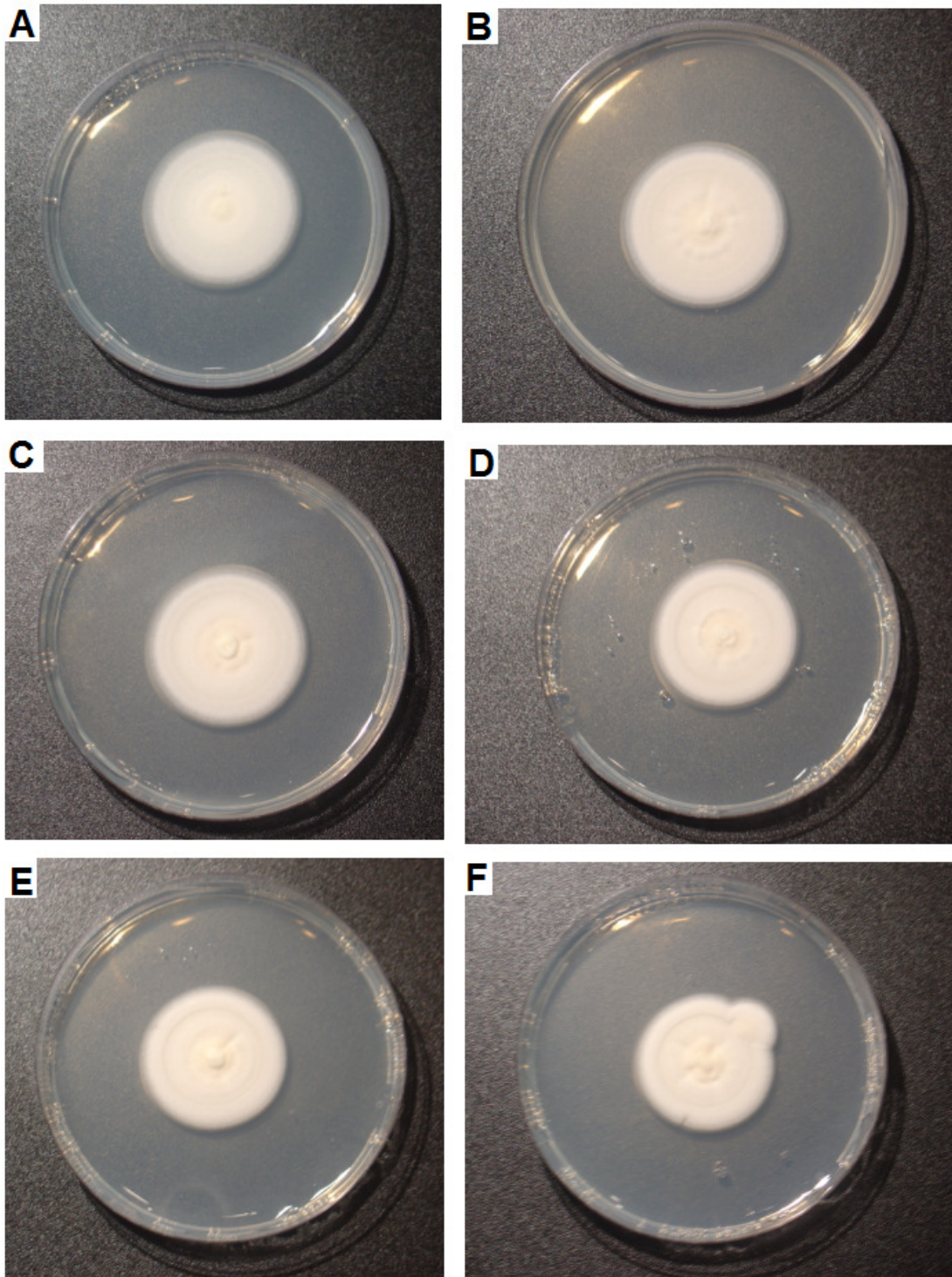


Figura 3.4 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na morfologia do *P. chrysogenum* CLONA2 ao fim de 168 horas de incubação a 25 °C com glucose (I). Painel A: Controlo sem 2,4-D; Painel B: 10 mg/L de 2,4-D; Painel C: 25mg/L de 2,4-D; Painel D: 50mg/L de 2,4-D; Painel E: 100mg/L de 2,4-D; Painel F: 300 mg/L de 2,4-D.

Nas placas que continham o pesticida foi detectado um maior crescimento das hifas na vertical, ou seja para cima, indicando uma possível protecção do microrganismo devido à toxicidade do 2,4-D. Isto pode ser observado na Figura 3.5, que apresenta uma borda branca mais ampla no controlo devido ao crescimento na horizontal e uma borda branca menor nas placas que continham o herbicida, cujo o desenvolvimento das hifas foi superior na vertical.

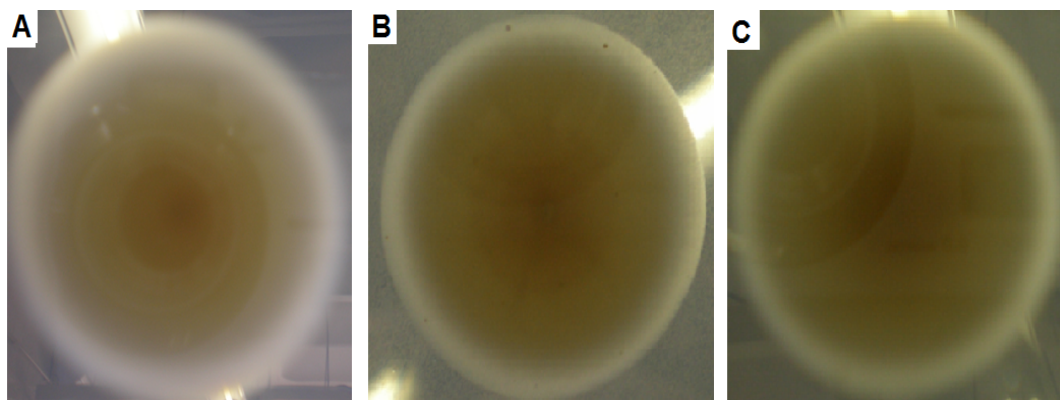


Figura 3.5 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na morfologia do *P. chrysogenum* CLONA2 em meio sólido ao fim de 168 horas de incubação a 25 °C (II). Parte detrás das placas. Painel A: Controlo sem 2,4-D; Painel B: 50 mg/L de 2,4-D; Painel C: 100 mg/L de 2,4-D.

3.2.3. Meio sólido suplementado com 2% de lactose

Para estudar o efeito da lactose como fonte de carbono suplementar, combinou-se diferentes concentrações de 2,4-D com 2% de lactose.

O Quadro 3.4 apresenta a média do crescimento apical (mm) de *Penicillium* em meio sólido com diferentes concentrações de 2,4-D e suplementado com lactose.

Quadro 3.4 - Média do crescimento apical (mm) do *Penicillium* em meio sólido suplementado com 2% de lactose.

Amostras	72 horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Controlo	12,5 \pm 0,4	18,6 \pm 0,9	24,6 \pm 1,2	34,0 \pm 1,8	41,0 \pm 0,8
10 mg/L	11,5 \pm 0,4	16,8 \pm 0,7	25,8 \pm 0,7	31,6 \pm 0,4	42,0 \pm 0,7
25 mg/L	13,0 \pm 0,4	18,0 \pm 0,7	24,0 \pm 0,6	37,0 \pm 1,1	42,5 \pm 0,4
50 mg/L	13,0 \pm 0,5	18,0 \pm 0,5	24,5 \pm 1,0	36,5 \pm 0,6	41,5 \pm 1,0
100 mg/L	12,9 \pm 0,6	17,5 \pm 0,6	24,0 \pm 0,6	36,0 \pm 0,5	42,6 \pm 0,7
300 mg/L	9,5 \pm 0,5	14,6 \pm 0,7	22,0 \pm 0,5	35,8 \pm 0,7	40,0 \pm 0,7
500 mg/L	*N.C	*N.C	*N.C	*N.C	*N.C
1000 mg/L	*N.C	*N.C	*N.C	*N.C	*N.C

*N.C: Não apresentou crescimento

Como pode ser observado no Quadro 3.4, o *P. chrysogenum* apresentou crescimento em concentrações de até 300 mg/L, sendo totalmente inibido para concentrações mais elevadas. Assim como no caso da adição da glicose, o acréscimo da lactose como fonte suplementar inibiu o crescimento do microrganismo em concentrações superiores a 300 mg/L, facto que não foi observado quando foi exposto ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético como única fonte de carbono.

Os resultados da taxa de crescimento apical (TCA) encontram-se apresentados na Figura 3.6.

O acréscimo da lactose ao meio favoreceu o crescimento do *Penicillium* em relação ao controlo, facto que não foi observado na adição de outros açúcares. Apesar das hifas apresentarem maior fragilidade, o fungo foi capaz de crescer melhor, dependendo da concentração de 2,4-D no meio, sendo este crescimento superior ao controlo em aproximadamente: 5% para 10 mg/L, 8% para 25 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L; e de 13% para 300 mg/L de 2,4-D. Estes resultados sugerem que a combinação da lactose com o 2,4-D favorece o desenvolvimento do fungo em meio sólido. Em contrapartida, para concentrações superiores a 300 mg/L foi observado uma inibição do crescimento em 100%.

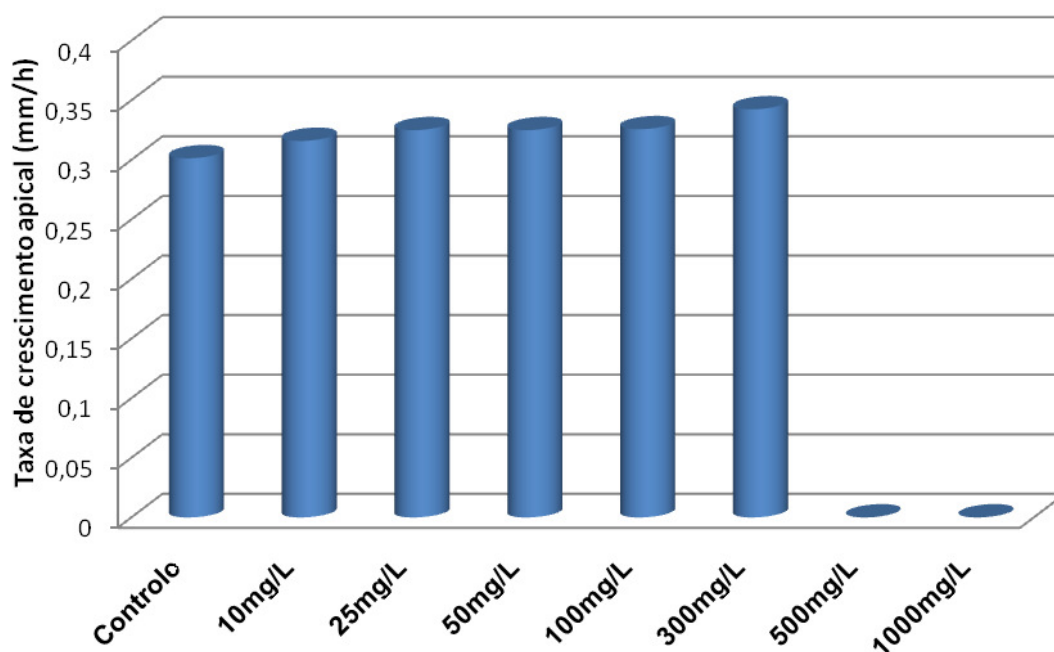


Figura 3.6 - Taxa de crescimento apical do *P. chrysogenum* CLONA2 a diferentes concentrações de 2,4-D em meio czapeck (sem sacarose) suplementado com 2% de Lactose. Os diâmetros das colónias foram determinados tomando como referência a borda externa branca das colónias durante 7 dias a 25 ° C. O controlo refere-se ao meio sem a adição do herbicida.

Como pode ser observado na Figura 3.7, os esporos produzidos pelo *P. chrysogenum* foram diferentes do controlo quando crescidos em meio suplementado com 2,4-D. O controlo apresentou esporos brancos nas bordas e verdes ao centro. Já as placas que continham 2,4-D apresentaram esporos brancos, e o seu crescimento fez-se mais na horizontal, com as hifas presentes nas bordas quase transparentes. No centro das placas observou-se pigmentos com coloração alaranjado.

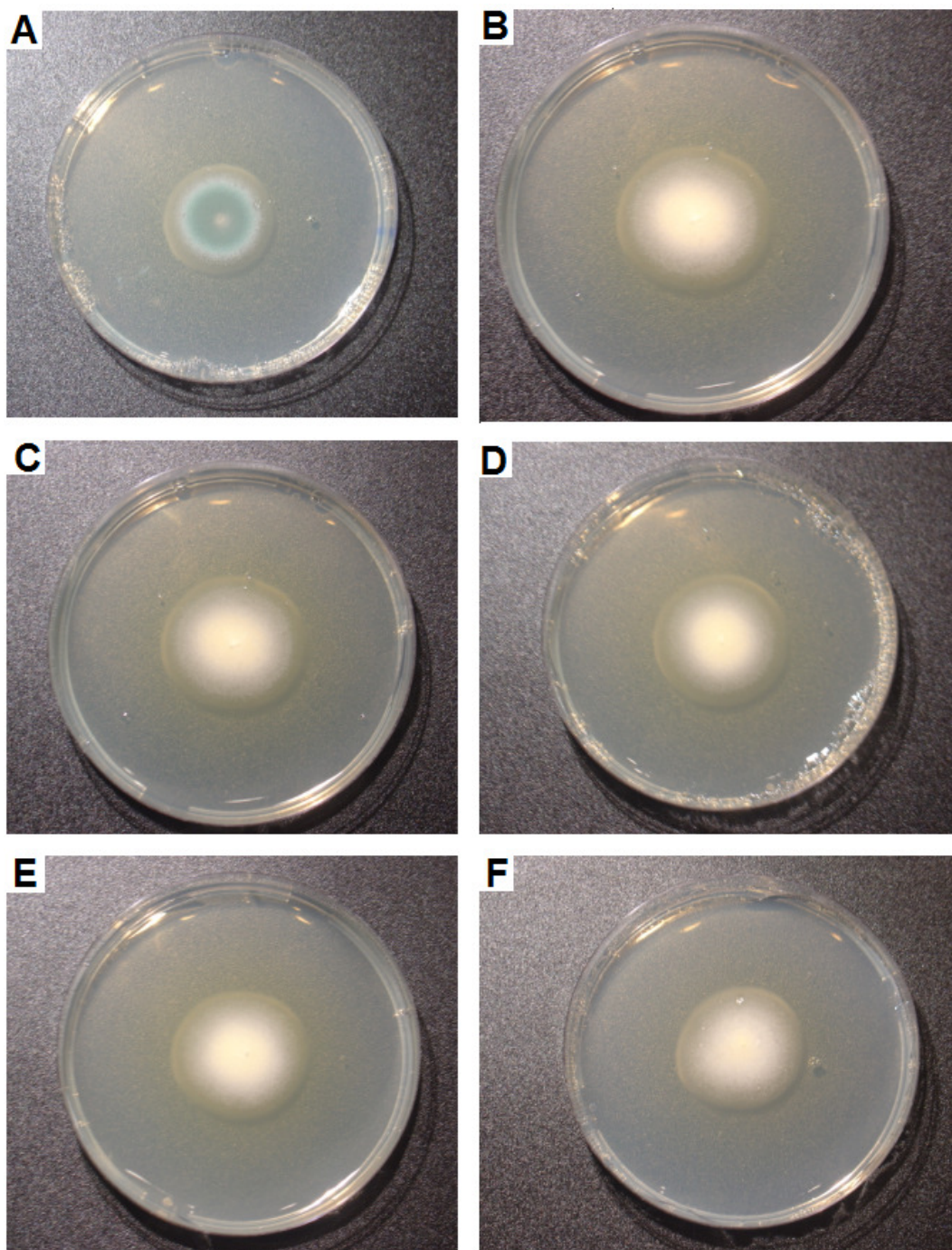


Figura 3.7 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D combinados com lactose na morfologia do *P. chrysogenum* CLONA2 no fim de 168 horas de incubação a 25°C. Painel A: Controlo sem 2,4-D; Painel B: 10 mg/L de 2,4-D; Painel C: 25 mg/L de 2,4-D; Painel D: 50 mg/L de 2,4-D; Painel E: 100 mg/L de 2,4-D; F: 300 mg/L de 2,4-D.

A produção do pigmento no centro das placas mostrou ser dependente da concentração do herbicida, à medida que a concentração de 2,4-D aumenta a produção do pigmento também aumenta.

3.2.4. Meio sólido suplementado com 2% de sacarose

Para a análise do efeito da sacarose como fonte de carbono suplementar, realizou-se uma série de ensaios combinando diferentes concentrações de 2,4-D com 2% de sacarose.

O Quadro 3.5 apresenta a média do crescimento apical (mm) do *Penicillium* em diferentes concentrações de 2,4-D em meio sólido suplementado com sacarose.

Quadro 3.5 - Crescimento apical (mm) do *P. chrysogenum* em meio sólido na presença de 2,4-D e sacarose como fontes de carbono.

Amostras	72 horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Controlo	18,5 ±0,4	27,0 ±0,5	35,5 ±0,7	42,3 ±0,8	51,2±0,7
10 mg/L	17,5 ±0,9	25,5 ±0,9	34,0 ±0,6	40,6 ±1,1	48,6 ±0,6
25 mg/L	18,2 ±0,5	26,3 ±0,5	33,9 ±0,6	40,5 ±0,4	48,6 ±0,6
50 mg/L	18,6 ±0,6	26,9 ±0,7	34,5 ±0,4	41,1 ±0,7	47,7 ±0,7
100 mg/L	18,0 ±0,7	25,8 ±1,2	35,0 ±1,0	41,8 ±1,2	49,5 ±0,4
300 mg/L	16,0 ±0,5	23,3 ±0,5	31,5 ±0,4	37,6 ±0,8	46,3±0,6
500 mg/L	14,5 ±0,6	21,0 ±0,3	27,4 ±0,9	34,2 ±0,9	41,5 ±0,7
1000 mg/L	8,9 ±0,5	14,5 ±0,4	18,1 ±0,5	23,2 ±0,5	29,5 ±0,5

Como pode ser observado no Quadro 3.5, o *P. chrysogenum* apresentou crescimento em concentrações de até 1000 mg/L. Esta tolerância demonstra uma protecção da sacarose frente à toxicidade do 2,4-D, facto que não foi observado com nenhuma outra fonte de carbono.

Os resultados da taxa de crescimento apical encontram-se apresentados na Figura 3.8.

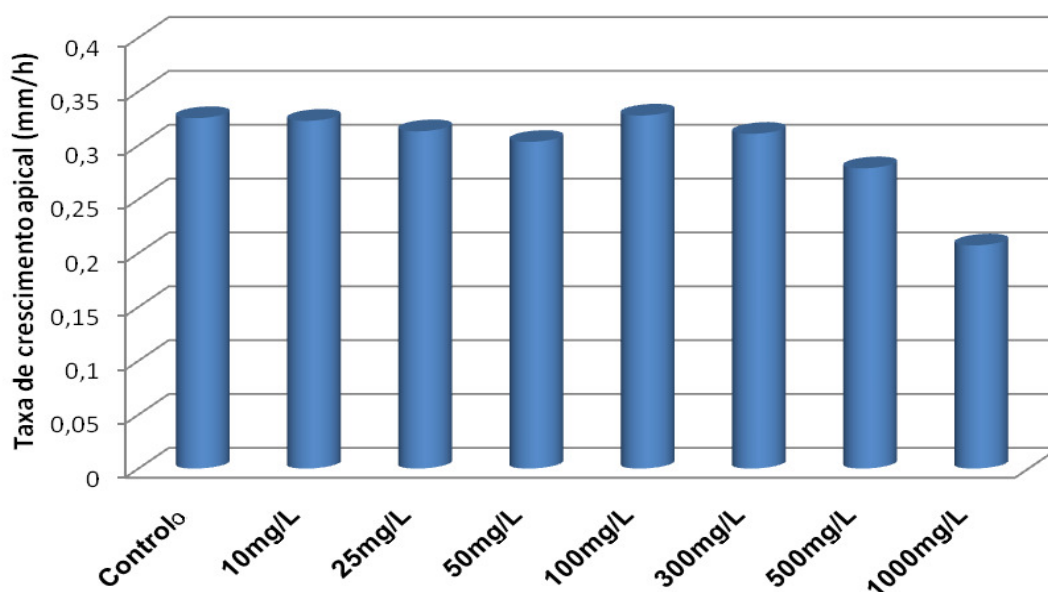


Figura 3.8 - Taxa de crescimento apical do *P. chrysogenum* CLONA2 a diferentes concentrações de 2,4-D em meio czapeck suplementado com 2% de sacarose. Os diâmetros das colónias foram determinados tomando como referência a borda externa branca das colónias durante 7 dias a 25 °C. O controlo refere-se ao mesmo meio sólido utilizado, com excepção da adição do 2,4-D.

Como pode ser observado na Figura 3.8, a concentração de 10 mg/L não influenciou o crescimento do *Penicillium*, sendo este semelhante ao controlo. Já quando a concentração foi elevada para 25 mg/L e 50 mg/L apresentou uma inibição de aproximadamente 4% e 7%, respectivamente. Curiosamente quando a concentração foi elevada para 100 mg/L, a taxa de crescimento apical voltou a ser semelhante ao controlo, ou seja, como se não apresentasse qualquer efeito negativo no crescimento do *Penicillium*. Para eliminar qualquer dúvidas sobre uma possível falha humana durante a execução dos ensaios, os testes foram novamente repetidos e os resultados obtidos foram semelhantes aos anteriores.

Quando a concentração foi elevada para 300 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L a inibição foi novamente detectada, sendo aproximadamente 4,5%, 14% e 36%, respectivamente. A Figura 3.9 apresenta fotografias das placas após 168 horas de incubação a 25°C.

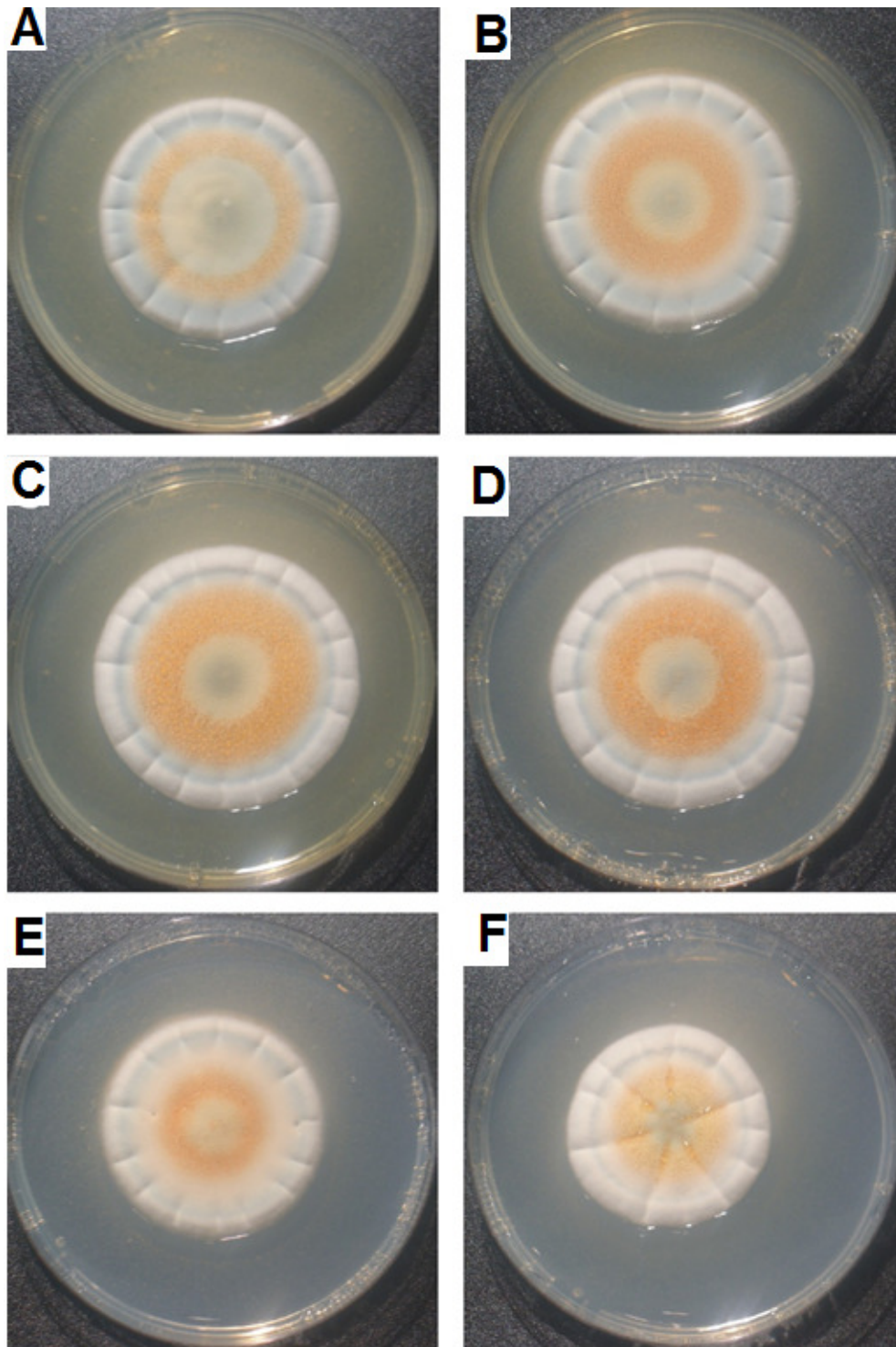
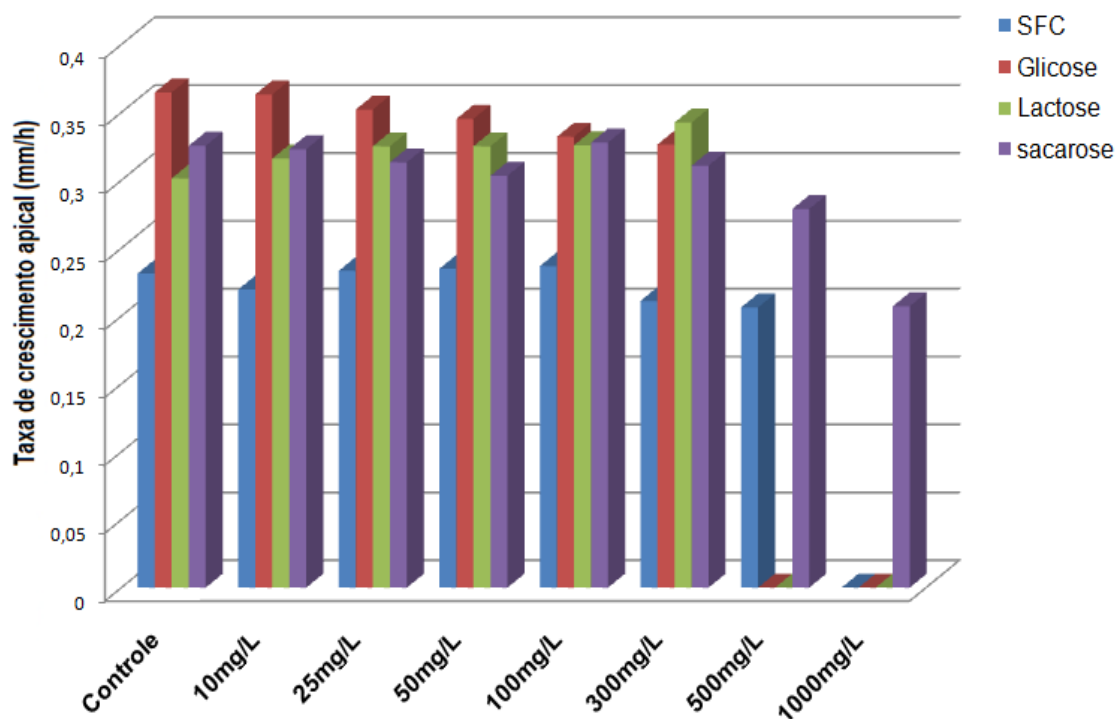


Figura 3.9 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D combinado com sacarose na morfologia do *P. chrysogenum* CLONA2 ao fim de 168 horas de incubação a 25°C. Painel A: Controle sem 2,4-D; Painel B: 10 mg/L de 2,4-D; Painel C: 50 mg/L de 2,4-D; Painel D: 300 mg/L de 2,4-D; Painel E: 500 mg/L de 2,4-D; Painel F: 1000 mg/L de 2,4-D.

As placas apresentaram diferenças significativas em termos de pigmentação após 168 horas de incubação. Como observado na Figura 3.9, houve um incremento alaranjado no pigmento produzido em concentrações crescentes do herbicida. Possivelmente, estes resultados são devido ao efeito inibitório do 2,4-D no crescimento do *P. chrysogenum* CLONA2.

3.2.5. Comparação do crescimento do *Penicillium* em meio sólido entre as diferentes fontes de carbono utilizadas.

Os resultados obtidos da taxa de crescimento apical (mm/h) dos ensaios realizados em meio sólido com diferentes fontes de carbono foram dispostos em forma de gráfico e encontram-se presentes na Figura 3.10 para melhor visualização.



*SFC: sem fonte de carbono

Figura 3.10 - Taxa de crescimento apical (mm/h) de todas as amostras em meio sólido com diferentes fontes de carbono.

Como se pode observar na Figura 3.10, a combinação da glicose com o 2,4-D favoreceu o maior crescimento do microrganismo em comparação com os resultados obtidos sem fonte de carbono suplementar. Esta diferença no crescimento do *Penicillium* foi expressa em percentagem, tendo-se obtido aproximadamente 57% para 10 mg/L, 52 % para 25 mg/L, 49% para 50 mg/L, 43% para 100 mg/L e 41% para 300 mg/L.

A glicose foi a fonte de carbono que permitiu o melhor crescimento do microrganismo em concentrações de até 50 mg/L de 2,4-D. Porém, quando esta concentração foi elevada a 100 mg/L e 300 mg/L foi observado uma inibição na taxa de crescimento apical, até à interrupção do crescimento para concentrações de 500 mg/L e 1000 mg/L.

Apesar da presença da lactose não ter favorecido o crescimento do fungo nas diferentes concentrações do herbicida em relação à adição da sacarose e glicose, este açúcar permitiu um maior crescimento, tendo este sido observado na concentração de 300 mg/L, sendo o valor superior ao obtidos nas outras duas fontes de carbono estudadas.

A suplementação com a sacarose foi a única capaz de favorecer o crescimento do *Penicillium* em concentrações de até 1000 mg/L.

Este ensaio permitiu concluir que a adição de diferentes fontes de carbono interferem no crescimento do *Penicillium*: a presença da Lactose favorece o crescimento do fungo em meio sólido na presença do 2,4-D; a presença da glicose permitiu a obtenção dos maiores valores correspondentes a taxa de crescimento apical e a sacarose permitiu o crescimento do microrganismo em concentrações de até 1000 mg/L do herbicida.

3.3.Crescimento em meio sólido face a adição de 2,4- diclorofenol, um intermediário descrito na degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

A principal via descrita para a biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, envolve a remoção da cadeia lateral com o resultado da

hidroxilação do ácido 2,4-D a 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) (Fukumori e Hausinger, 1993).

Muitos microrganismos foram descritos por possuírem a capacidade de degradar o 2,4-DCP até à formação do ácido succínico (Alexander e Aleem, 1961; Macrae, 1963; Paris e Lewis, 1973; Fernley e Evans, 1959; Bell, 1960; Chu e Kirsch, 1972; Loos, 1967). Entretanto, o 2,4-DCP apresentou toxicidade para outras espécies de microrganismos, entre eles *Pseudomonas putidas* (6 mg/L), *Entosiphon sulcatum* (0,5 mg/L) e *Uronema parduczi* (1,6 mg/L) (Pesticide Data Base, 2010).

Devido às diferenças na toxicidade do 2,4-DCP dependendo dos microrganismos expostos, foi realizado um teste em meio sólido para estudar a capacidade do *Penicillium chrysogenum* de crescer na presença do 2,4-diclorofenol, avaliando a toxicidade deste intermediário para a estirpe em estudo.

Os testes foram realizados em triplicado e os resultados individuais e as rectas de regressão linear utilizadas para calcular a taxa de crescimento apical encontra-se presente no anexo VIII. A taxa de crescimento apical (mm/h) obtida para as diferentes concentrações de 2,4-DCP está apresentado na Figura 3.11.

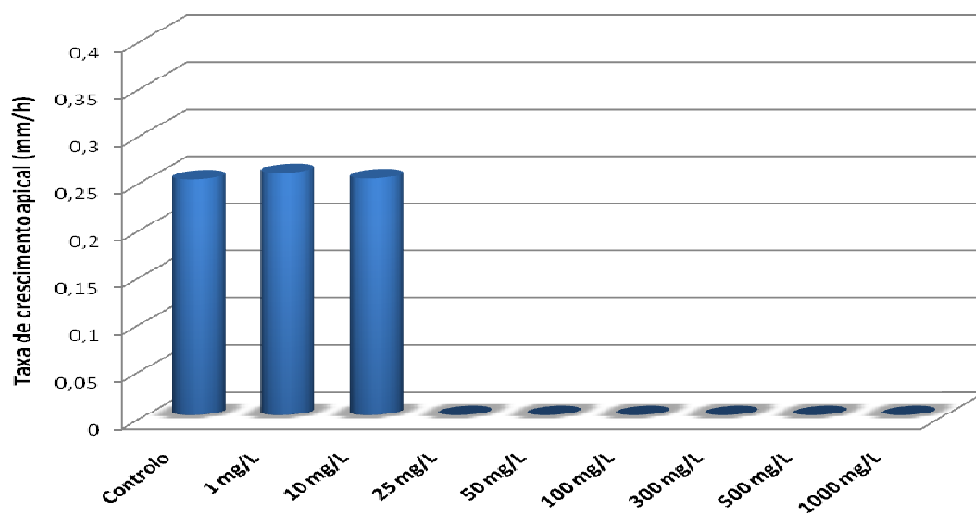


Figura 3.11 - Taxa de crescimento apical do *P. chrysogenum* CLONA2 a diferentes concentrações de 2,4-diclorofenol em meio sólido de composição idêntica ao meio czapeck, excepto a sacarose. Os diâmetros das colónias foram determinados tendo como referência a

borda externa branca das colônias durante 7 dias a 25 °C. O controlo refere-se ao mesmo meio sólido utilizado, mas sem a adição do 2,4-diclorofenol.

A adição de 1 mg/L e 10 mg/L de 2,4-DCP não apresentaram efeitos significativos na taxa de crescimento apical de *Penicillium* em relação ao controlo. Porém, em concentrações superiores a 10 mg/L a presença do 2,4-DCP inibiu o crescimento do microrganismo, e desta forma, exerceu um efeito tóxico sobre o *Penicillium*.

Comparando com os resultados expostos na Secção 3.2.1, o 2,4-DCP apresentou uma toxicidade superior para o *Penicillium* do que o próprio herbicida (2,4-D), inibindo o seu crescimento em concentrações superiores a 10 mg/L. Já a presença do 2,4-D favoreceu o crescimento em concentrações de até 100 mg/L, apresentando inibição do crescimento a 300 mg/L e 500 mg/L, e não sendo observado crescimento para a concentração de 1000 mg/L deste herbicida.

Considerando a influência negativa do 2,4-diclorofenol no crescimento do *Penicillium* em meio sólido e sendo este elemento descrito como o primeiro intermediário na degradação do 2,4-D em meio líquido, a formação do 2,4-DCP pode interferir na capacidade de degradação do herbicida pelo *Penicillium*.

3.4. Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅)

É designada por matéria biodegradável aquela que pode ser consumida e assimilada como fonte de energia pela população de microrganismos decompositores do ambiente. A sua utilização como alimento implica a oxidação ou degradação, causando a redução das moléculas complexas em espécies mais simples, libertando energia e dióxido de carbono (Rodier, 1981).

Com a finalidade de dar suporte aos resultados obtidos sobre a biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, foram realizados ensaios da Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅) para avaliar a capacidade de utilização do 2,4-D como fonte de energia pela estirpe estudada.

3.4.1. Influência de diferentes lavagens do micélio na Carência Bioquímica de Oxigénio.

Para analisar a interferência causada pelo número de diferentes lavagens do micélio na Carência Bioquímica de Oxigénio ao fim de cinco dias, as células foram lavadas uma e três vezes com uma solução de 0,85% de NaCl.

Hauginger e Fukumori (1995) descreveram a importância do Fe (II) como um co-factor na biodegradação do 2,4-D por uma estirpe de *Alcaligenes eutrophus*, não podendo ser substituído por outros co-factores semelhantes como o manganês. Em contrapartida, Souza (1999) identificou a presença da actividade de uma peroxidase dependente do manganês durante a degradação do 2,4-D por *Pseudomonas putida* e *Phanerochaete chrysosporium*. Atendendo ao exposto, estes ensaios também tinham como finalidade a adição de diferentes concentrações de manganês (Mn) com o objectivo de avaliar a sua influência na velocidade de biodegradação do 2,4-D, sendo analisado o consumo de oxigénio de 24 em 24 horas durante 5 dias.

Os resultados individuais encontram-se no anexo IX e as médias obtidas no Quadro 3.6.

Como pode ser observado no Quadro 3.6, uma lavagem do micélio não é suficiente para remoção dos compostos orgânicos procedentes do pré-inóculo. Com uma lavagem, os valores passam do limite máximo do aparelho em 120 horas, e os resultados obtidos são semelhantes para todos os casos estudados. Desta forma, uma lavagem não mostrou ser suficiente para a eliminação dos resíduos orgânicos provenientes do pré-inóculo.

Quadro 3.6 - Média da CBO₅ (mg/L) com 1 e 3 lavagens do micélio

Amostra	1 lavagem				
	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Microrganismo sem fonte de carbono	13	18	26	31	*
Microrganismo com 2,4 D	67	90	*	*	*
2,4-D com 0,29 µM de Manganês	52	73	85	95	*
2,4-D com 0,59 µM de Manganês	58	72	81	88	*
2,4-D com 1,18 µM de Manganês	52	72	85	87,5	*

Amostra	3 lavagens				
	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Microrganismo sem fonte de carbono	20	27	34	38	42
Microrganismo com 2,4 D	26	37	45	51	55
2,4-D com 0,29 µM de Manganês	25	30	41	44	50
2,4-D com 0,59 µM de Manganês	23	34	41	46	51
2,4-D com 1,18 µM de Manganês	40	53	63	69	74

*Valor superior à capacidade de detecção do aparelho respirométrico.

Já com 3 lavagens, os resultados apresentaram valores inferiores devido a uma maior remoção dos resquícios do meio complexo, podendo ser visualizada a influência causada pelas diferentes concentrações de manganês quando adicionadas ao meio.

Da análise à Figura 3.12, pode ser observado que a presença do 2,4-D aumentou 31% a CBO₅ em comparação ao controlo com o microrganismo, que apresentou um consumo de 42 mg/L de O₂ devido aos resquícios provenientes do meio de pré-inóculo. Este aumento da Carência Bioquímica de Oxigénio indica a metabolização do 2,4-D devido ao maior consumo de O₂ detectado pelo sistema respirométrico.

Não é observada uma diferença significativa nos resultados referentes à adição de 0,29 µM e 0,59 µM de manganês em relação ao oxigénio consumido quando comparados aos controlos com os microrganismo e 2,4-D.

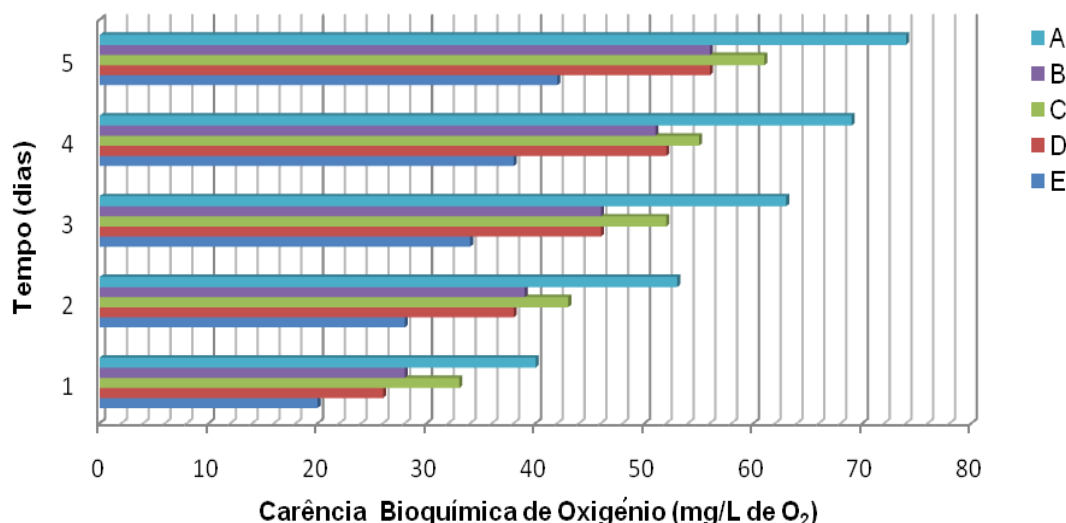


Figura 3.12 – Carência Bioquímica de Oxigênio (mg/L) com 3 lavagens. A: 2,4-D com 1,18 µM de manganês; B: 2,4-D com 0,59 µM de manganês; C: 2,4-D com 0,29 µM de manganês; D: controle com microrganismo e 2,4-D; E: controle microrganismo sem 2,4-D.

Já quando a concentração de manganês é aumentada para 1,18 µM, observa-se também um aumento da actividade metabólica do *Penicillium*, observando-se um aumento na CBO₅ de aproximadamente 34% em relação aos ensaios controlos que contém apenas o microrganismo e 2,4-D.

Este teste foi fundamental para a realização dos ensaios que estão apresentados na próxima Secção, tendo-se determinado três lavagens para todos os casos estudados. A concentração de manganês foi fixada em 1,18 µM nos ensaios posteriores, quer seja de CBO₅, quer seja nos ensaios de fermentação.

3.4.2. Influência da adição conjunta de diferentes co-substratos no CBO₅

Hausinger e Fukumori (1995), descreveram as propriedades do gene *tfdA* responsável pelo primeiro passo de biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) por uma estirpe *Alcaligenes eutrophus*. O produto génico deste gene apresentou capacidade de catalisar a reacção de hidroxilação, sendo descrita como uma dioxigenase *tfdA*, Ferro (II) e α-

cetoglutarato dependente, capaz de permitir a sequência da metabolização do cetoglutarato a succinato e CO₂ durante a biodegradação do 2,4-D.

Entretanto, a combinação do α -cetoglutarato e dos iões Fe (II) não foi suficiente para sustentar a actividade enzimática por períodos de tempo longos. A presença do ácido ascórbico permitiu a redução das taxas de perdas da actividade enzimática (Hausinger e Fukumori, 1995).

Com base no exposto, foram realizados ensaios respirométricos com objectivo de estudar a influência da adição do α -cetoglutarato, ácido ascórbico e manganês como co-substratos na biodegradação do 2,4-D pelo *Penicillium chrysogenum* CLONA2.

Os ensaios foram realizados em duplicado para os controlos e triplicado para as amostras. Os resultados individuais encontram-se descritos no anexo X e as médias estão apresentados no Quadro 3.7.

Quadro 3.7 – Média da Carência Bioquímica de Oxigénio (mg/L) utilizando diferentes substratos.

Controlos	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Microrganismo	27,0	34,0	39,0	42,0	45,0
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	28,0	41,0	49,0	54,0	58,0
Manganês	32,0	43,0	51,0	57,0	61,0
Ácido α -cetoglutárico	59,0	85,0	95,0	*	*
Ácido ascórbico	24,5	28,5	32,0	35,5	38,0
Amostras	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
2,4-D + Manganês	40,6	54,0	63,3	70,0	74,6
2,4-D+ Ácido ascórbico	52,6	69,3	76,6	80,6	83,3
2,4-D+ Ácido α -cetoglutárico	76,6	*	*	*	*

*Valor superior à capacidade de detecção do aparelho respirométrico.

Nota: Todos os controlos contém microrganismos. Os nomes que aparecem nos controlos referem-se aos co-substratos adicionados ao meio.

Comparando individualmente os resultados obtidos com a adição dos co-substratos, pode-se observar diferenças na metabolização do ácido 2,4-

diclorofenoxiacético. Quando é acrescentado o ácido ascórbico ao meio com microrganismo, na ausência do xenobiótico, observa-se que este reage de forma semelhante ao controlo com o microrganismo, ou seja, a adição do ácido ascórbico não é capaz de influenciar o metabolismo do fungo. A Figura 3.13 apresenta um gráfico com as situações expostas para melhor visualização dos resultados obtidos devido à adição do ácido ascórbico.

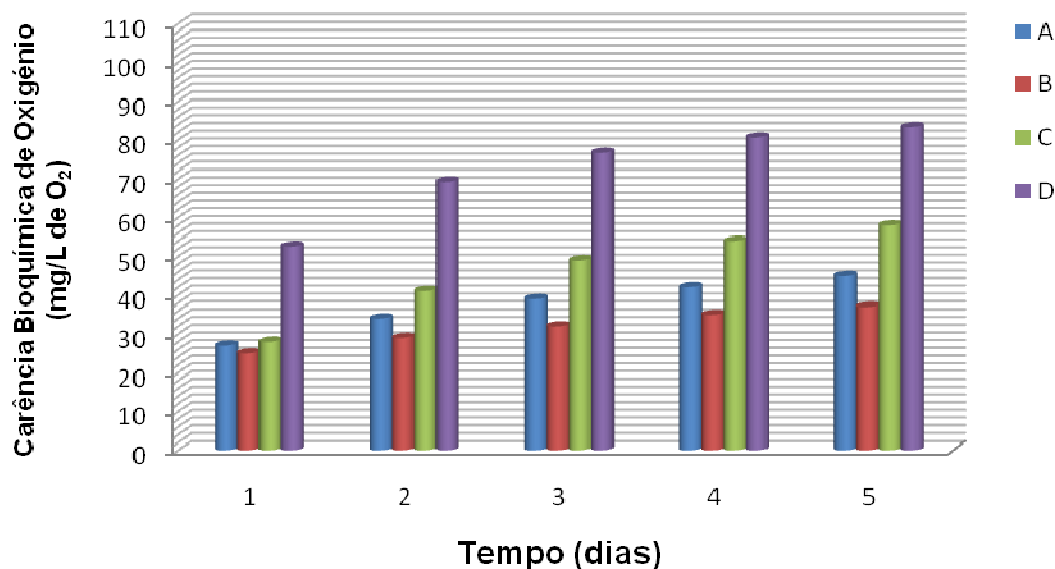


Figura 3.13 - Carência Bioquímica de Oxigênio com adição de ácido ascórbico ao meio. Legenda: A: Somente microrganismo; B: microrganismo com adição de ácido ascórbico; C: apenas microrganismo e 40mg/L de 2,4-D; D: combinação do 2,4-D e ácido ascórbico.

Porém, quando é acrescentado 40 mg/L de 2,4-D na presença do ácido ascórbico, o valor do CBO₅ aumenta aproximadamente 119% após 5 dias de incubação com respeito ao controlo com o microrganismo e ácido ascórbico sem a presença do herbicida. Segundo os resultados obtidos, no controlo que possuía apenas o microrganismo e o 2,4-D, observa-se um aumento de aproximadamente 44%. Esta diferença ocorre, possivelmente, devido ao aumento da metabolização do 2,4-D na presença do ácido ascórbico.

Quando se estudou a influência da adição do manganês ao ensaio, observou-se um aumento de aproximadamente 35% no controlo com Mn e microrganismo em relação ao controlo de microrganismo, sugerindo que a

presença deste co-substrato auxilia a metabolização dos resquícios das substâncias provenientes do meio complexo, mesmo depois de três lavagens. Ao comparar os resultados do CBO₅ com o controlo do 2,4-D, observa-se que este aumenta aproximadamente 27% do valor referente à adição de manganês na presença de 2,4-D. Este facto indica que a presença do manganês não afecta significativamente a biodegradação do xenobiótico.

A Figura 3.14 apresenta um gráfico para melhor visualização da CBO₅ realizado na presença de manganês.

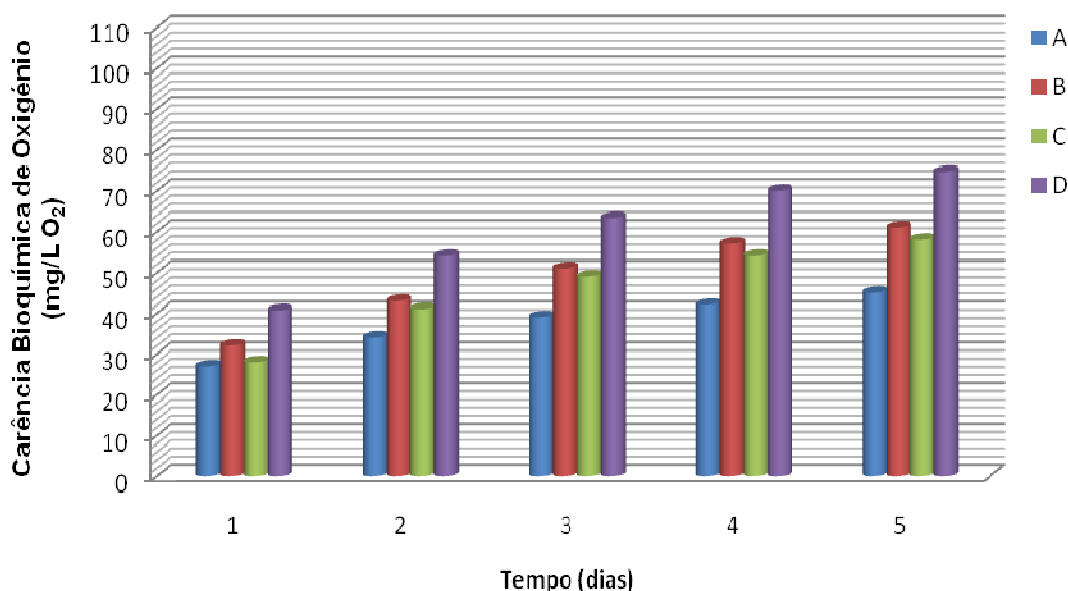


Figura 3.14 – Efeito da adição de manganês no ensaio respirométrico. Legenda: A: Somente microrganismo; B: Microrganismo com adição de manganês; C: Apenas microrganismo e 40mg/L de 2,4-D; D: Combinação do 2,4-D e manganês.

Porém, quando a comparação passa para a presença do α -cetoglutarato, os resultados condizem com a literatura, ou seja, a velocidade de biodegradação do 2,4-D é aumentada na presença do α -cetoglutarato. Isto pode ser observado quando é colocado o α -cetoglutarato sem a presença do 2,4-D, o microrganismo é capaz de metabolizar este co-substrato libertando CO₂, tendo-se atingido o valor máximo do aparelho após quatro dias de incubação a temperatura controlada de 20 °C, na ausência de luz.

A Figura 3.15 apresenta um gráfico com uma melhor visualização da influência do α -cetoglutarato no consumo de oxigênio na presença do 2,4-D.

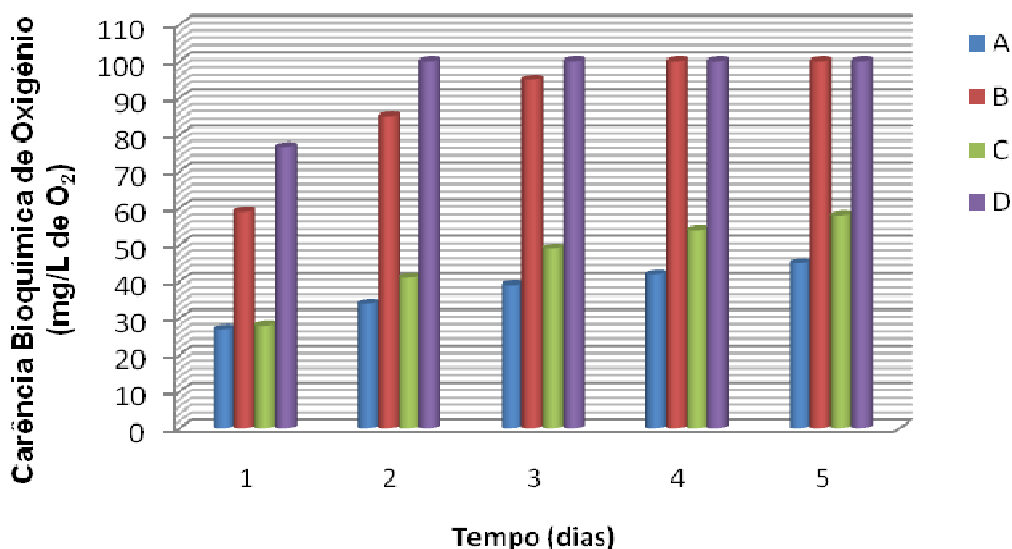


Figura 3.15 – Influência do α -cetoglutarato na Carência Bioquímica de Oxigênio. Legenda: A: Somente microrganismo; B: Microrganismo com adição de α -Keto; C: Apenas microrganismo e 40 mg/L de 2,4-D; D: Combinação de 40 mg/L de 2,4-D e α -cetoglutarato.

Quando é adicionado ao meio 40 mg/L de 2,4-D em conjunto com o α -cetoglutarato, observa-se um aumento no consumo de oxigênio de 30% em relação ao controle somente com o α -cetoglutarato nas primeiras 24 horas, ou seja, o microrganismo passa a consumir o α -cetoglutarato em conjunto com o 2,4-D, produzindo mais CO₂ e esgotando a capacidade máxima de leitura do aparelho num tempo inferior.

Comparando todos os co-substratos estudados, observa-se que o α -cetoglutarato é o que apresenta maior influência na metabolização do ácido 2,4-diclorofenoxiacético. A Figura 3.16 apresenta um gráfico comparativo entre a percentagem da Carência Bioquímica de Oxigênio de todos os co-substratos analisados após 24 horas de incubação com 40 mg/L de 2,4-D.

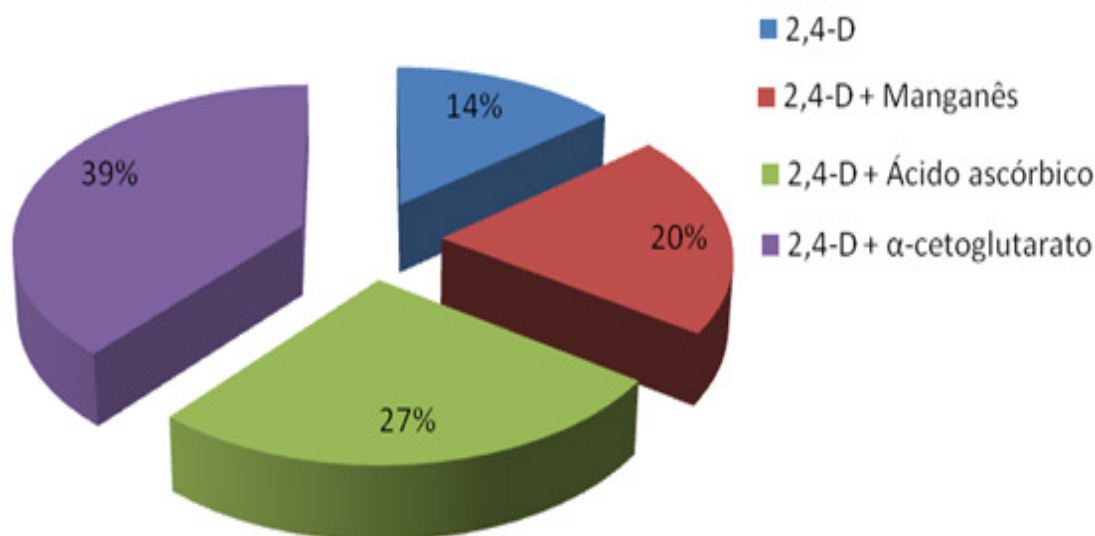


Figura 3.16 - Comparação da percentagem da Carência Bioquímica de Oxigénio observada após 24 horas de incubação a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com 40 mg/L de 2,4-D. Tomou-se como base de 100% o somatório dos valores da CBO₅ das quatro situações apresentadas.

Pelos ensaios de CBO₅ realizados, pode-se afirmar que o *Penicillium* tem capacidade de biodegradar o 2,4-D, mineralizando-o em CO₂. Também, pode-se afirmar que a presença de co-substratos influenciam esta degradação de forma positiva, ou seja, auxiliam a metabolização do 2,4-D, sendo o ácido α-cetoglutarico o melhor co-substrato.

3.5. Morfologia do *P. chrysogenum* CLONA2

A morfologia dos fungos é responsável pelo rápido crescimento destes em meios de cultura. A heterogeneidade estrutural é considerada como uma das características mais importantes dos pellets de fungos, sendo afectada pela densidade e pela limitação de nutrientes e oxigénio (Leitão *et al.*, 2007).

Os fungos podem formar aglomerados ou não, dependendo de vários factores, tais como composição do meio de pré-inóculo, intensidade de agitação, pH entre outros (Leitão *et al.*, 2007).

A Figura 3.17 apresenta duas fotografias do *P. chrysogenum* CLONA2 após incubação durante 72 horas a 25 °C em meio complexo de cultura com 2% de NaCl. Como pode ser observado, o *Penicillium* possui uma morfologia em forma de Pellet, com hifas mais dispersas e um ponto central característico do início da aglomeração do micélio.

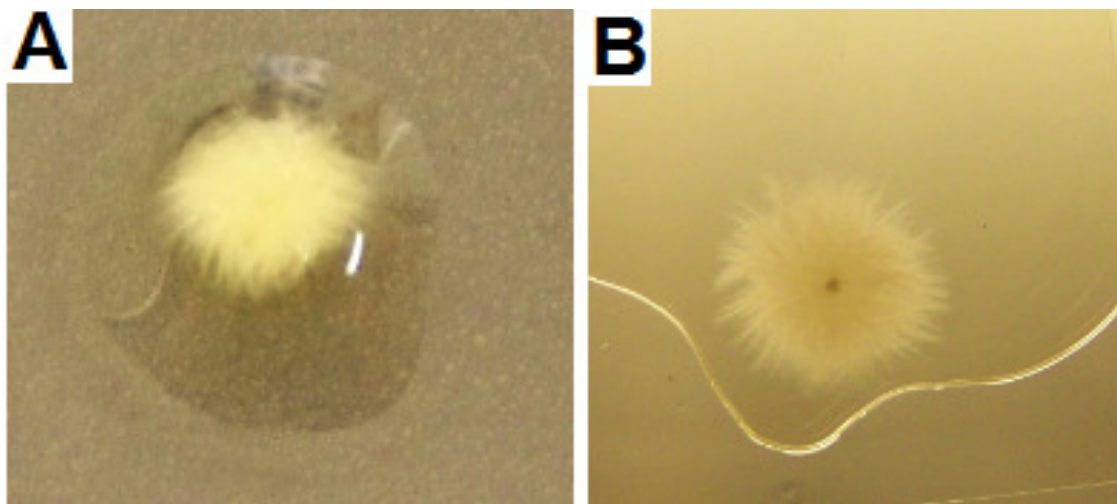


Figura 3.17 - Morfologia do *P. chrysogenum* CLONA2 após 72 horas de incubação a 25 °C e 160 rpm. Painei A: Pellet; Painei B: Micélio com lamela.

3.6. Análise da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético em meio líquido.

Os ensaios realizados em meio sólido (apresentados na Secção 3.1) serviram para verificar a influência no crescimento e a toxicidade do ácido 2,4-diclorofenoxiacético exercida sobre o *Penicillium*, sendo o ponto de partida para as análises em meio líquido, uma vez que este tipo de experiência envolve métodos mais demorado e dispendioso.

Desta forma, foram realizados ensaios para definir a interferência causada pela adição de açúcares (lactose, glicose e sacarose), as melhores concentrações salinas (0%, 2% ou 5,9% de NaCl) e ainda a adição de co-substratos descritos na bibliografia como sendo capazes de melhorar o rendimento da biodegradação do 2,4-D.

Os resultados obtidos encontram-se presentes nas Secções seguintes.

3.6.1. Biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético face a adição de uma fonte de açúcar suplementar: sacarose, lactose e glicose.

Os microrganismos possuem capacidade de transformar alguns xenobióticos, mas nem sempre obtém energia e carbono a partir destas reacções, que conseqüentemente não promovem o crescimento microbiano levando a lise celular. Por vezes, os microrganismos apresentam falta ou a inibição de certas enzimas fundamentais para a utilização dos metabolitos provenientes desta transformação. Este facto, faz com que os microrganismos degradadores necessitem de um co-substrato para o seu crescimento (Nakagawa, 2003).

Nos ensaios descrito na Secção 3.2, com a adição dos diferentes açúcares em meio sólido, o *Penicillium* apresentou capacidade de crescer na presença de concentrações de até 1000 mg/L do herbicida consoante a fonte de carbono suplementar adicionada ao meio. A concentração de 100 mg/L deste herbicida promoveu o crescimento do *Penicillium*, tendo sido superior ao controlo em meio sólido sem suplementação de carbono.

Deste modo, os ensaios em meio de cultura MMFE sem adição de açúcares, foram realizados com 100 mg/L de 2,4-D. Após ser observado uma baixa percentagem de degradação (2%) do 2,4-D, o meio foi suplementado com 2% de sacarose, lactose e glicose, separadamente, para verificar a influência destes açúcares na degradação do herbicida.

A Figura 3.18 apresenta o gráfico obtido da degradação do herbicida nas diferentes fontes de carbono estudadas. Os tempos de incubação são diferentes devido à diferença do comportamento do microrganismo consoante o açúcar adicionado no meio, sendo os valores correspondentes ao dia que foi observado a lise celular do microrganismo. Os respectivos tempos de incubação para estes ensaios foram de 48 horas para as condições sem fonte de carbono, 9 dias para a lactose e 21 dias com glucose. A sacarose teve um tempo maior de incubação de 25 dias, tempo ao fim do qual ainda não se observava lise celular.

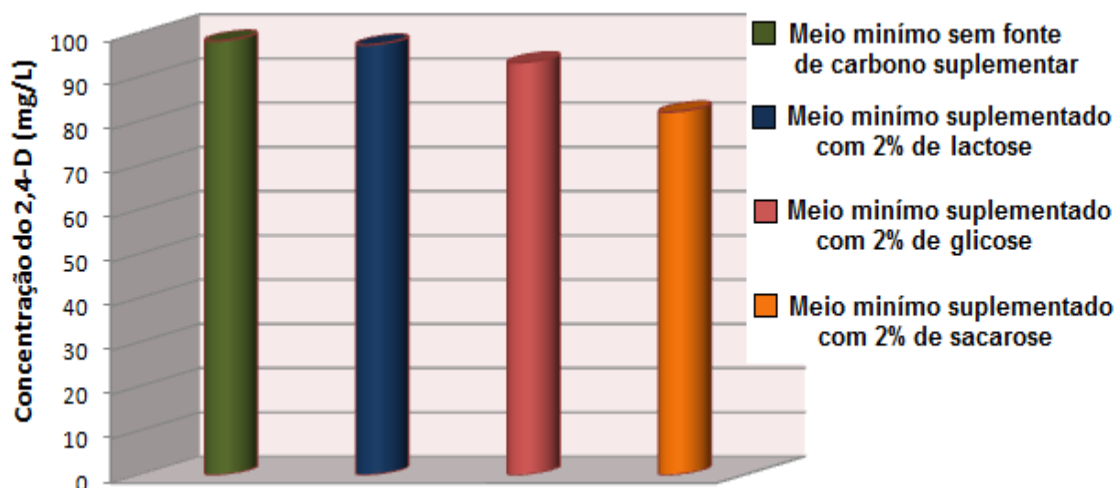


Figura 3.18 – Degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético pelo *Penicillium* em meio mínimo suplementado com 2% de sacarose, 2% de lactose, 2% de glucose e sem adição de açúcar (controle). Todos os ensaios foram realizados com o mesmo meio, com exceção da fonte de carbono e continham a presença do microrganismo.

As percentagens de degradação do xenobiótico observada foi de aproximadamente 2% para as condições sem adição de fonte de carbono suplementar (Controle), 3% para o meio suplementado com lactose, 7% para o meio suplementado com glucose e 18% para o meio suplementado com sacarose.

Em meio sólido, a lactose permitiu que o microrganismo tivesse um crescimento superior na presença do 2,4-D em comparação com o controle sem o herbicida. Contudo, em meio líquido a presença da lactose não favoreceu a biodegradação do 2,4-D. O *Penicillium* apresentou lise celular ao fim de 9 dias aumentando apenas 1% da degradação do herbicida em comparação com o controle.

A presença da glucose não alterou significativamente o desempenho do *Penicillium* na biodegradação do 2,4-D, aumentando apenas 5% da degradação do herbicida em relação ao controle. Uma possível explicação para esta baixa degradação, pode ser devido à facilidade com que a glucose é assimilada pelos microrganismos, e portanto, não favorece a produção das enzimas necessárias para degradação do xenobiótico.

Em meio sólido, a sacarose foi a melhor fonte de carbono suplementar, sugerindo que esta fonte de carbono desempenhou um papel de protecção do microrganismo, permitindo o seu crescimento em concentrações de até 1000 mg/L. Em meio líquido, este co-substrato aumentou o desempenho de degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético pelo fungo. Ao fim de 25 dias, o *P. chrysogenum* degradou aproximadamente 18% do 2,4-D, sem apresentar lise celular, porém, a fermentação foi interrompida devido ao tempo de incubação prolongado.

Apesar do microrganismo ter capacidade de degradar pelo menos 18 mg/L do herbicida na presença da sacarose, este ensaio não foi considerado favorável devido ao tempo de adaptação do microrganismo, podendo vir a ser considerado pouco viável no sector industrial.

3.6.2. Degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético na presença de 0%, 2% e 5,9% de NaCl.

Como a adição de 100 mg/L do 2,4-D em meio líquido MMFE com 2% de NaCl permitiu uma degradação de apenas 2% do 2,4-D, foram realizados alguns ensaios com a concentração inicial do herbicida reduzida para a metade. Os resultados obtidos foram promissores, apresentando uma degradação de aproximadamente 14% após 72 horas de incubação. Com base nestes resultados não se deu continuidade aos ensaios que envolviam a adição das fontes de carbono devido às diferenças significativas no que diz respeito ao tempo de incubação. Foram utilizados para os ensaios posteriores uma concentração de 50 mg/L do herbicida.

Devido às diferenças observadas na taxa de crescimento apical (mm/h) consoante a percentagem de NaCl adicionada ao meio sólido Czapeck (Secção 3.1), foram realizados ensaios de cultura submersa para definir a concentração salina capaz de permitir a melhor degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético em meio líquido e assim, estipular a concentração salina óptima da degradação do 2,4-D para os ensaios posteriores.

A Figura 3.19, apresenta o gráfico da degradação obtida do ácido 2,4-diclorofenoxiacético em mg/L após 72 horas de incubação, partindo de uma concentração inicial de 50 mg/L.

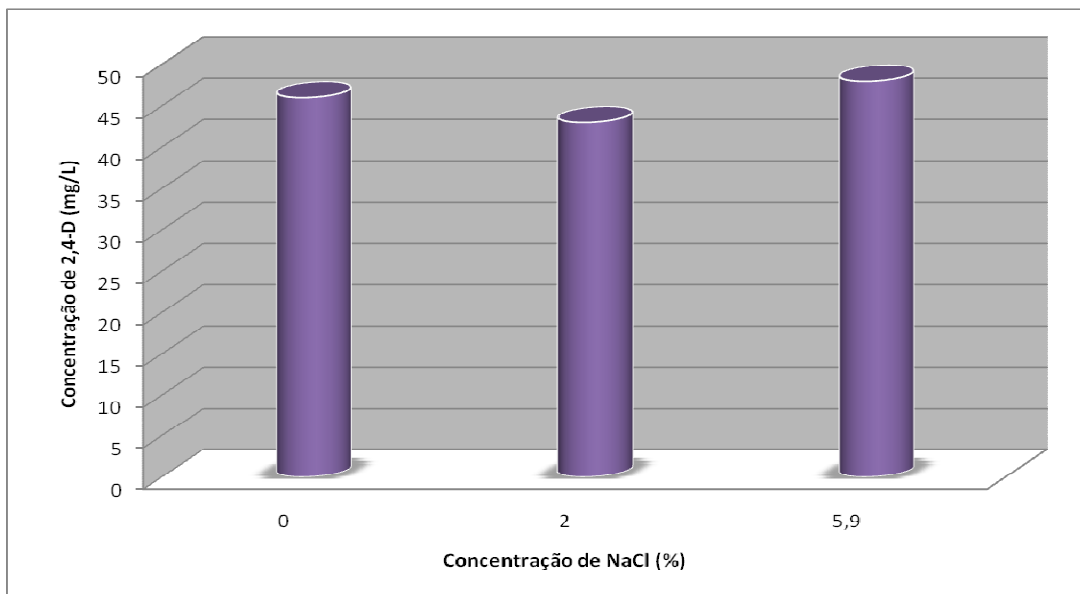


Figura 3.19 - Degradação do 2,4-D ao final de 72 horas, com diferentes concentrações salinas na presença de 1,18 μ M de manganês.

É evidente uma degradação superior do 2,4-D com 0% e 2% de NaCl. Como pode ser observado, após as 72 horas de incubação, houve uma diminuição de aproximadamente 8%, 14% e 4% do herbicida para as concentrações de 0%, 2% e 5,9% de NaCl, respectivamente.

A percentagem de degradação observada para a concentração de 5,9% de NaCl é considerada baixa para este ensaio, pois foi observado maiores degradações nas outras condições salinas (0% e 2% de NaCl). Porém, é um valor elevado em relação a outros microrganismos capazes de degradar o ácido 2,4-diclorofenoxiacético em porcentagens inferiores a 4% em condições ótimas, ou seja, sem a presença de um stress salino (Vroumsia *et al.*, 2005).

Pode-se afirmar que a percentagem de 4% obtida para a condição de 5,9 % de NaCl é derivado da degradação do herbicida, devido ao aumento observado na área respectiva ao tempo de retenção (T_R) de 2,48 min em relação ao controlo sem microrganismo (vide Figura 3.20). Este pico encontra-

se bem delineado, e apesar do estudo não ter por objectivo identificar a via metabólica da degradação do 2,4-D bem como os intermediários produzidos, pode-se dizer que esta variação observada na área deste pico é devido à produção de metabolitos provenientes da sua degradação.

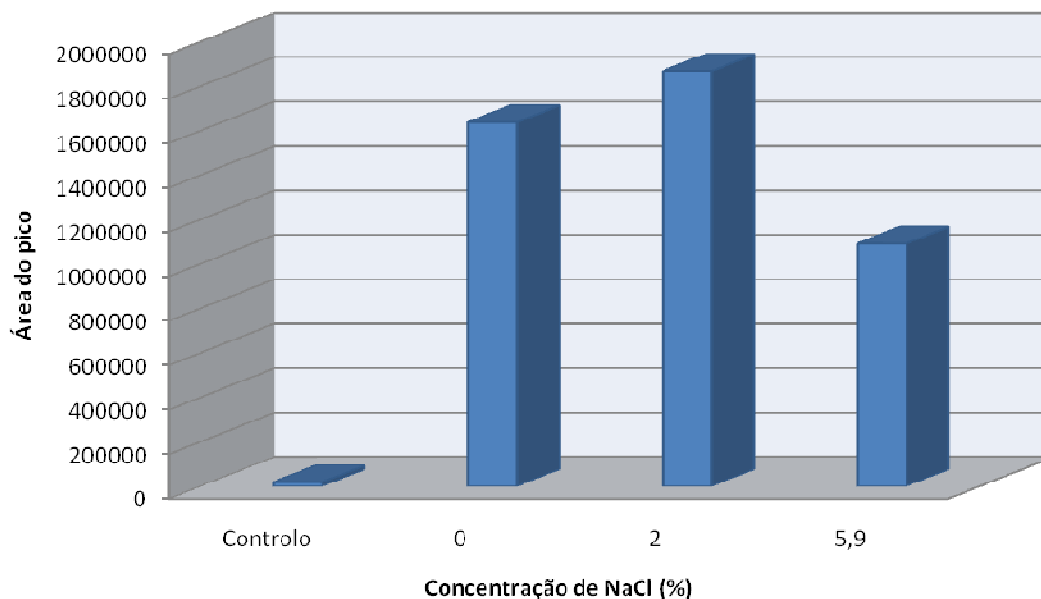


Figura 3.20 - Comparação entre os valores das áreas obtidas para o pico intermediário correspondente ao T_R 2,48 minutos nas diferentes condições salinas. O controlo não possui o microrganismo.

As correlações para este T_R são interessantes, uma vez que em cultura submersa com 2% de NaCl a área deste pico foi de 12% e 41% superior em comparação com as condições de 0% e 5,9% de NaCl, respectivamente. Esta percentagem superior observada pode ser derivada da maior degradação na condição salina de 2%, entretanto, somente pode-se afirmar este facto com um estudo das vias metabólicas da degradação do 2,4-D para todos os casos, o que como foi anteriormente referido não faz parte do objectivo deste trabalho e portanto será indicado como tema para trabalhos futuros.

Outros indícios que asseguram a degradação do 2,4-D nas condições salinas de 0%, 2% e 5,9% são as diferenças detectadas entre essas condições e o controlo. Como pode ser observado na Figura 3.21, a área dos picos referentes ao T_R de 3,63 min são superiores ao controlo em todas as condições

estudadas. A maior área observada neste T_R foi na condição salina de 2% em comparação com as outras duas condições (0% e 5,9%). Em contrapartida, para o T_R de 5,70 min, a condição de 2% de NaCl apresentou a menor área em todos os ensaios, sendo aproximadamente 65% inferior ao valor obtido no controle. A condição de 5,9% não apresentou variação significativa.

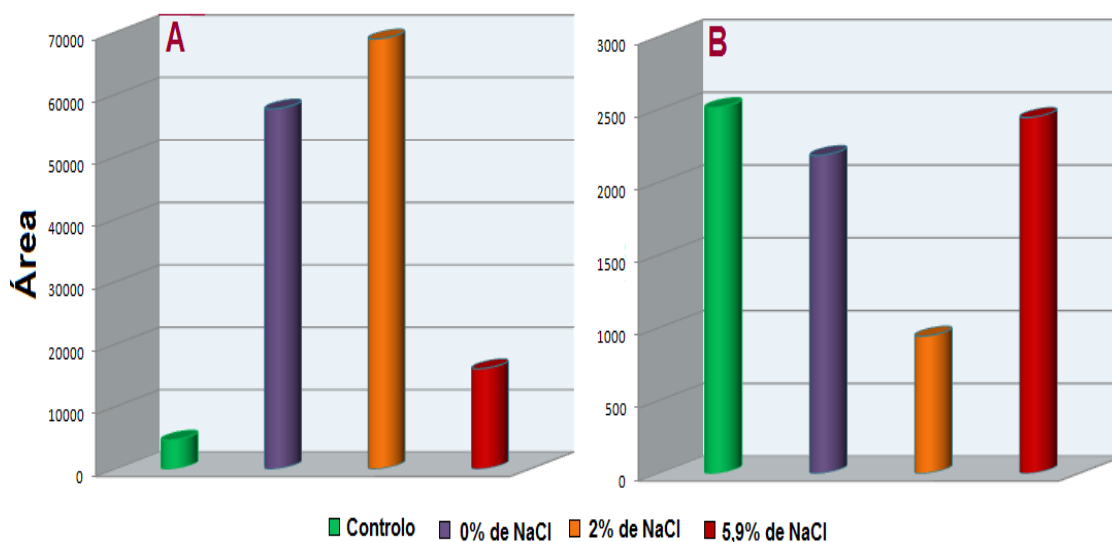


Figura 3.21 – Análise das áreas obtidas para dois tempos de retenção nas diferentes condições salinas. Painel A: Tempo de retenção 3,63 min; Painel B: Tempo de retenção 5,70 min.

Picos intermediários também foram observados para as concentrações de 0% e 2% de NaCl, não tendo sido detectados no controlo nem na condição de stress salino. A Figura 3.22. apresenta um cromatograma de cada situação após 72 horas de incubação.

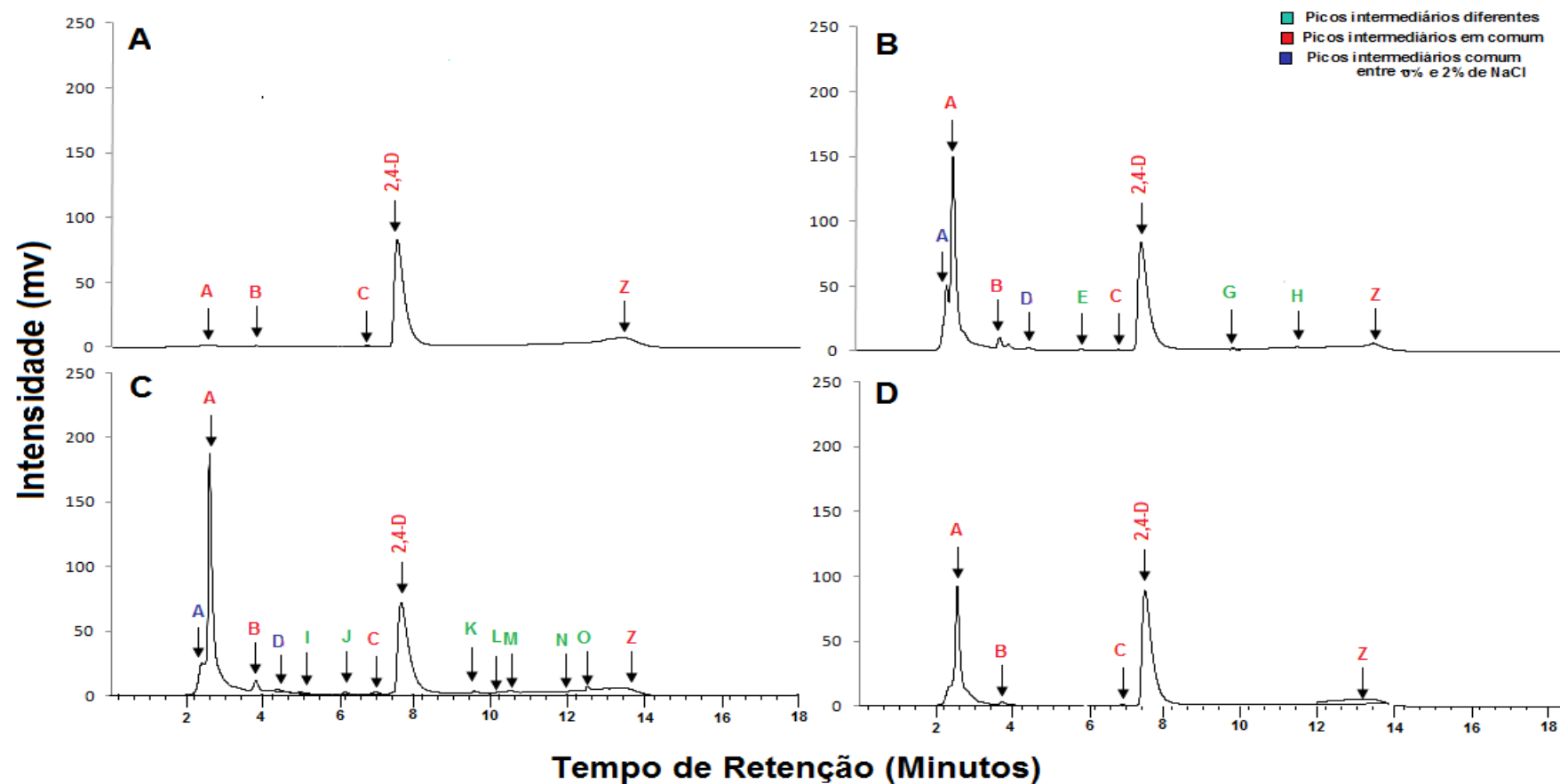


Figura 3.22 - Cromatogramas obtidos nos ensaios com diferentes concentrações salinas após 72 horas de incubação. Painel A: controle; Painel B: 0% de NaCl; Painel C: 2% de NaCl; Painel D: 5,9% de NaCl. Análise cromatográfica realizada segundo o método de gradiente com um tempo de corrida de 18 minutos. O controle corresponde as mesmas condições sem a presença do microrganismo.

Como pode ser observado na Figura 3.4, existem muitos intermediários diferentes entre as condições de salinidade de 0% e 2%. Essas diferenças apontam para possíveis vias de degradação diferentes nas condições salinas ensaiadas, uma vez que se a via metabólica fosse semelhante, ou seja, fosse utilizada para a degradação do herbicida a mesma via enzimática, todas as condições ensaiadas deveriam apresentar picos cromatográficos semelhantes com áreas proporcionais à percentagem de degradação observada devido à presença dos mesmos metabolitos produzidos (Schreiber, 2006). Como foi detectado a presença de picos intermediários diferentes e áreas diferentes entre as condições salinas e o controle, para além de um decréscimo na área do pico com o T_R correspondente ao 2,4-D, pode-se dizer que o microrganismo tem potencial para degradar o ácido 2,4-diclorofenoxiacético em qualquer uma das condições estudadas, com indícios de vias metabólicas diferentes.

A concentração salina que permitiu a maior degradação do herbicida foi de 2%, além de ser uma condição considerada adequada para as condições das águas residuais, visto que uma água residual não é isenta de sais.

3.6.3. Biodegradação do 2,4-D em diferentes concentrações salinas com adição conjunta de três co-substratos: manganês, α -cetoglutarato e ácido ascórbico.

Para avaliar a influência da adição de alguns substratos descritos como importantes para as vias metabólicas na degradação do 2,4-D em outras estirpes de fungos filamentosos e bactérias, foi adicionado manganês, α -cetoglutarato e ácido ascórbico às culturas realizadas na presença de 50 mg/L de 2,4-D em diferentes concentrações salinas.

A Figura 3.23, apresenta um gráfico correspondente à degradação do 2,4-D em mg/L.

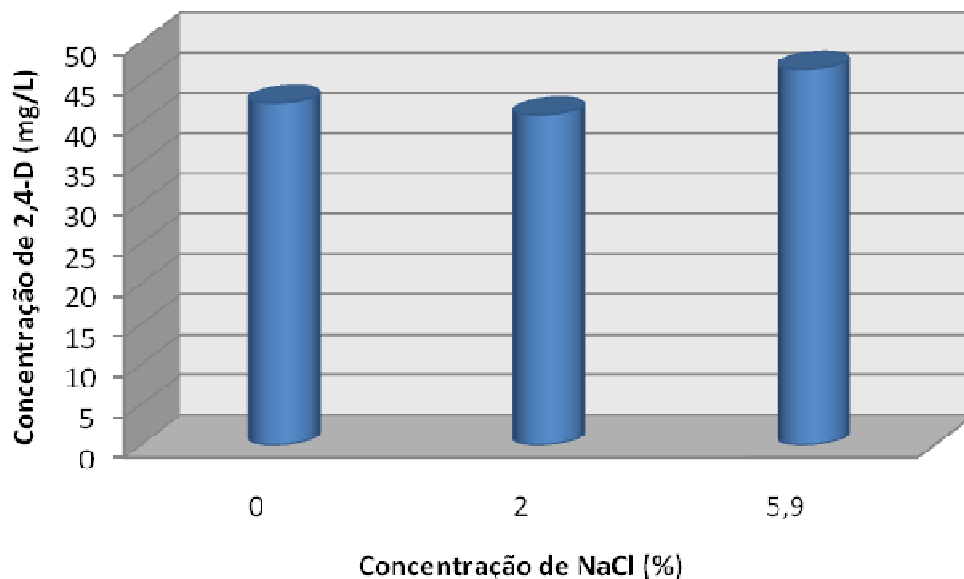


Figura 3.23 - Degradação do 2,4-D ao fim de 72 horas, a partir de uma concentração inicial de 50 mg/L na presença de manganês, α -Keto e ácido ascórbico com diferentes concentrações salinas (0%, 2% e 5,9% de NaCl).

A presença dos substratos aumentou 2% a degradação do xenobiótico nas culturas com 5,9% de NaCl. Apesar deste valor continuar a ser inferior aos obtidos nas outras duas concentrações de sal (0% e 2% de NaCl), a adição dos substratos ao meio de cultura permitiu um maior desempenho do *Penicillium* na degradação do 2,4-D em condições de stress salino.

A influência da adição dos substratos no desempenho da degradação do herbicida pelo fungo também foi notada nas concentrações salinas de 0% e 2%, uma vez que o valor observado da degradação aumentou de 8% e 14% para 15% e 18%, respectivamente.

Os presentes resultados indicam que as percentagens obtidas são devidas à degradação do herbicida, pois foram detectadas diferenças significativas nas áreas dos picos dos cromatogramas. Como pode ser observado no Painei A da Figura 3.24, a área do T_R de 2,45 min foi inferior para as condições salinas de 0% e 5,9%, existindo pouca variação para os ensaios de 2% de NaCl. Em contrapartida, no T_R de 3,63 min apresentado no painei B,

o maior valor observado foi para a condição salina de 2% e o menor valor para os ensaios com stress salino.

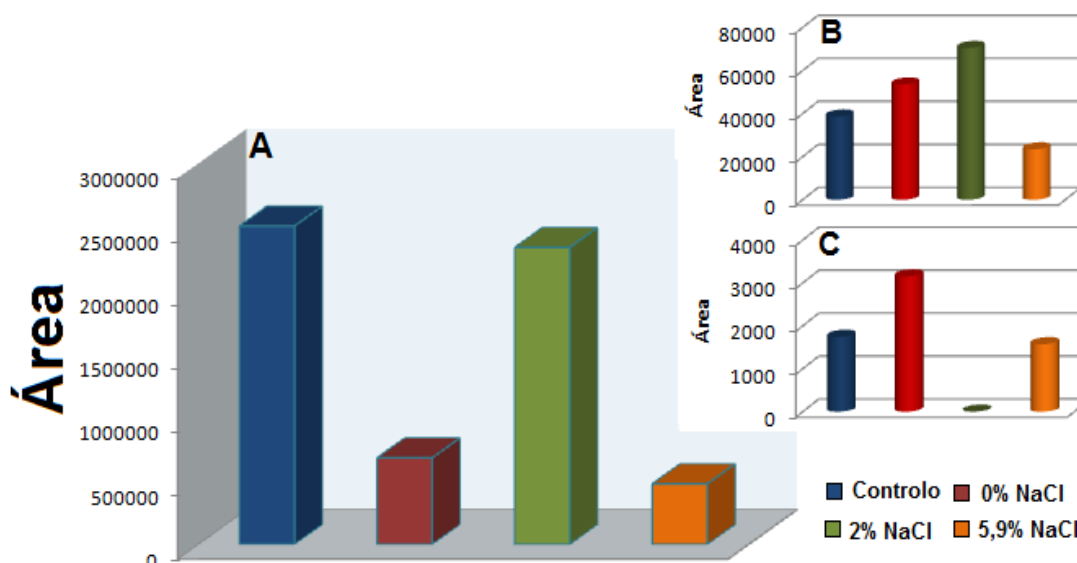


Figura 3.24 – Comparação das áreas obtidas para três tempo de retenção nas diferentes concentrações salinas. Painel A: T_R 2,45 min; Painel B: T_R 3,63 min; Painel C: T_R 5,70 min. O controlo representa o ensaio sem o microrganismo.

No Painel C pode ser observado uma área aproximadamente 80 vezes superior ao controlo para a condição isenta de sal. A condição salina de 2% não apresentou no cromatograma nenhuma área integrada para este tempo de retenção. Não foram observadas diferenças significativas na área integrada para a condição de 5,9% em relação ao controlo.

Os ensaios apresentaram ainda T_R intermediários característicos de biodegradação não existentes no controlo. A Figura 3.25. apresenta alguns cromatogramas obtidos na análise do 2,4-D após 72 horas de incubação.

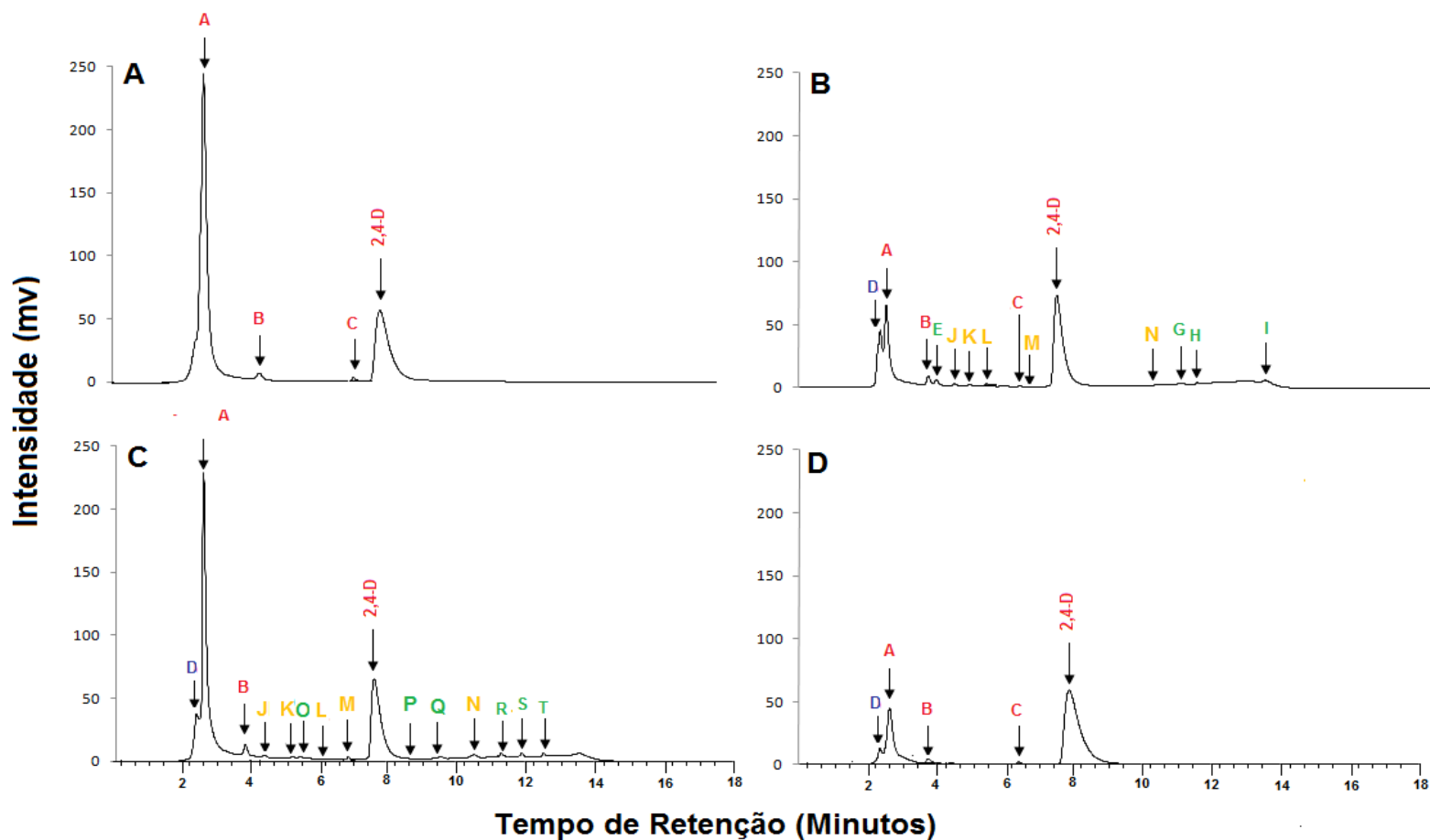


Figura 3.25 - Cromatogramas referentes às diferentes concentrações salinas e adição dos substratos α -cetoglutarato, ácido ascórbico e manganês. Painei A: controle, painei B: 0% de NaCl; Painei C: 2% de NaCl; Painei D: 5,9% de NaCl. As cores e letras semelhantes indicam a presença de picos com o mesmo T_R entre as integrações cromatográficas. Análise cromatográfica foi realizada segundo método gradiente com um tempo de corrida de 18 minutos.

As diferenças observadas nos picos intermediários apresentados na Figura 3.3, reforçam a idéia de vias metabólicas diferentes nas condições apresentadas para a degradação do 2,4-D pelo *Penicillium*.

Pode afirmar-se que o acréscimo dos co-substratos potenciaram a degradação do 2,4-D nas diferentes condições salinas estudadas, sendo a maior percentagem de degradação observada na adição de 2% de NaCl. Estes co-substratos foram estudados individualmente e os resultados serão apresentados nas Secções seguintes.

3.6.4. Influência dos diferentes co-substratos na degradação do 2,4-D

Ensaio realizado por Souza (1999), mostraram que a degradação do 2,4-D pelo *P. chrysosporium* e pela *P. putida* era dependente da concentração inicial do herbicida, tendo sido observado uma maior degradação em concentrações menores do herbicida. Com o intuito de estudar o efeito de diferentes co-substratos na degradação do 2,4-D pelo *Penicillium*, os ensaios seguintes foram realizados com 40 mg/L de 2,4-D.

No gráfico apresentado na Figura 3.26, encontra-se os valores obtidos da degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético na presença de diferentes co-substratos (manganês, ácido ascórbico e α -cetoglutarato) com objectivo de verificar a influência individual de cada co-substrato na degradação do herbicida pelo *Penicillium*.

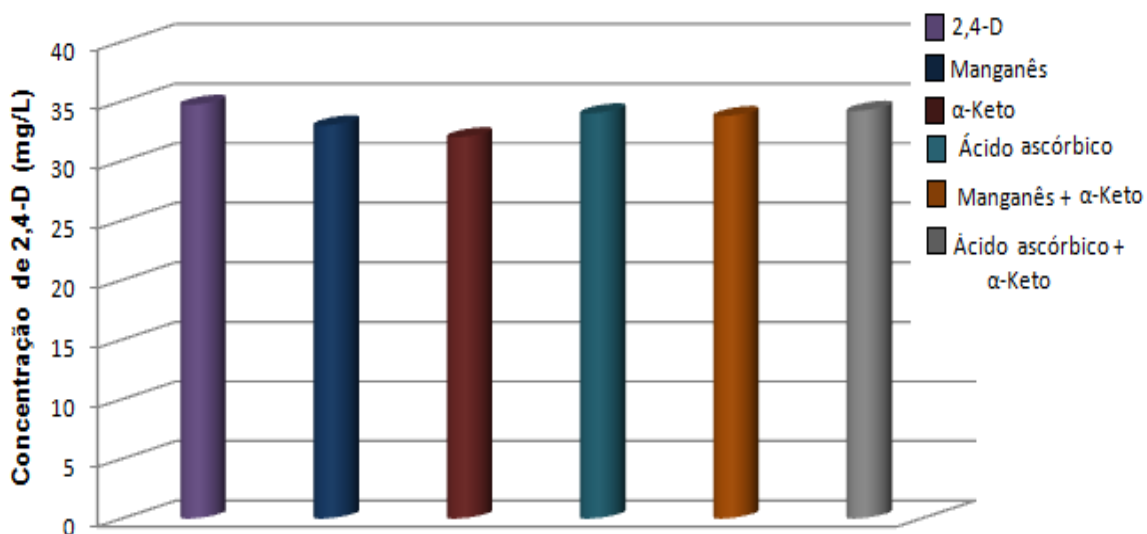


Figura 3.26 - Degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético após 24 horas na presença de diferentes co-substratos. Todos os ensaios foram realizados em meio MMFE 2% de NaCl, com uma concentração inicial de 40 mg/L do 2,4-D, variando apenas a adição dos co-substratos: 1mM de α -Keto, 200 μ M de ácido ascórbico e 1,18 μ M de manganês.

A melhor degradação do herbicida foi obtida com a adição do α -cetoglutarato, permitindo uma degradação aproximada de 19% nas primeiras 24 horas. As porcentagens de degradação do 2,4-D obtidas para os outros co-substratos foram aproximadamente 13%; 17,5%; 15%; 15,5% e 14,5% para as condições de 2,4-D; manganês; ácido ascórbico; manganês com α -cetoglutarato; ácido ascórbico com α -cetoglutarato, respectivamente.

Com base nestes resultados, definiu-se o α -cetoglutarato como sendo o co-substrato que melhor aumentou o desempenho da degradação do herbicida nas primeiras 24 horas. Este facto pode corresponder com a via de degradação descrita por Fukumori e Hausinger (1993), onde a degradação do herbicida por *Alcaligenes* pode estar condicionada por uma enzima dioxigenase-cetoglutarato/dependente, motivo pelo qual o processo de degradação é acelerado quando se adiciona o α -cetoglutarato ao meio de cultura. Porém, não pode ser eliminada a hipótese de que o microrganismo utilize o co-substrato como fonte de carbono através do cometabolismo.

3.6.5. Influência do pH na biodegradação do 2,4-D na presença do α -cetoglutarato.

Os fungos filamentosos entre outros microrganismos apresentam comportamentos diferentes consoante as condições do meio ao qual se encontram expostos. O pH é uma das condições fundamentais para o crescimento dos microrganismos, visto que os pH extremos, seja ácidos ou básicos, são capazes de inactivar a maior parte das enzimas responsáveis pela produção de energia, levando à lise celular (Deacon, 1997) .

Deacon (1997), descreve que o valor de pH óptimo para o desenvolvimento de fungos filamentosos varia entre 5,00 e 7,00. Em contrapartida, Junior e Pereira (2007), realizaram ensaios com fungos dos géneros *Chaetomium*, *Thielavia*, *Penicillium* e *Aspergillus* na presença de nitrato de chumbo e diferentes valores de pH, do qual todos os microrganismos estudados apresentaram um maior crescimento nas condições que envolviam valores de pH próximos de 9,00. Já o *Penicillium chrysogenum* CLONA2 foi descrito como sendo capaz de degradar 300 mg/L de fenol em meios de cultura com pH em torno de 5,60 e 5,70 (Leitão *et al.*, 2007).

Atendendo ao exposto, foram realizados alguns ensaios com adição de α -cetoglutarato e 2,4-D em diferentes condições de pH do meio de cultura inicial para verificar a influência deste parâmetro na biodegradação do herbicida, e desta forma, poder otimizar um meio de cultura que aumente a capacidade de biodegradação do xenobiótico pelo *P. chrysogenum*. Para a determinação da biomassa e do pH, de modo a estudar a influência deste no meio líquido, foram recolhidas amostras a diferentes intervalos de tempo.

A degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético em função do pH do meio encontra-se no gráfico apresentado na Figura 3.27.

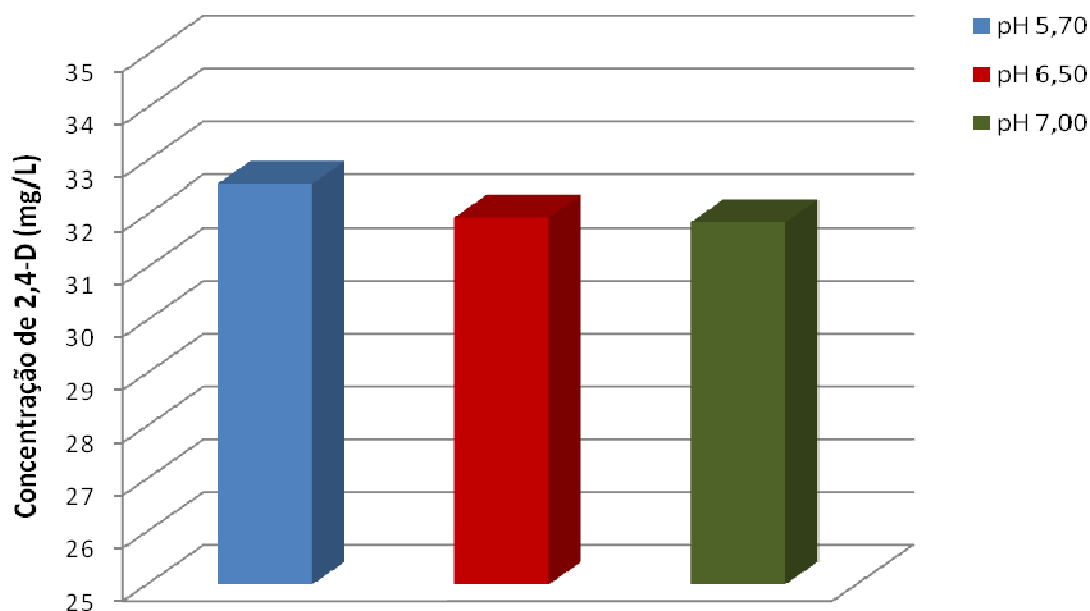


Figura 3.27 - Degradação do 2,4-D nas diferentes condições de pH ao fim de 48 horas.

As percentagens obtidas da degradação do herbicida para o valor de pH inicial do meio de cultura (MMFE) nas condições de pH 5,70, pH 6,50 e pH 7,00 foram aproximadamente 18,5%, 20,0 % e 20,5%, respectivamente.

As diferenças obtidas podem estar relacionadas com o crescimento do microrganismo e o pH do meio, uma vez que algumas actividades enzimáticas são inativadas em pH ácido.

A Figura 3.28 apresenta os gráficos dos resultados de pH e biomassa obtidos nos ensaios com as diferentes condições iniciais de pH do meio de cultura.

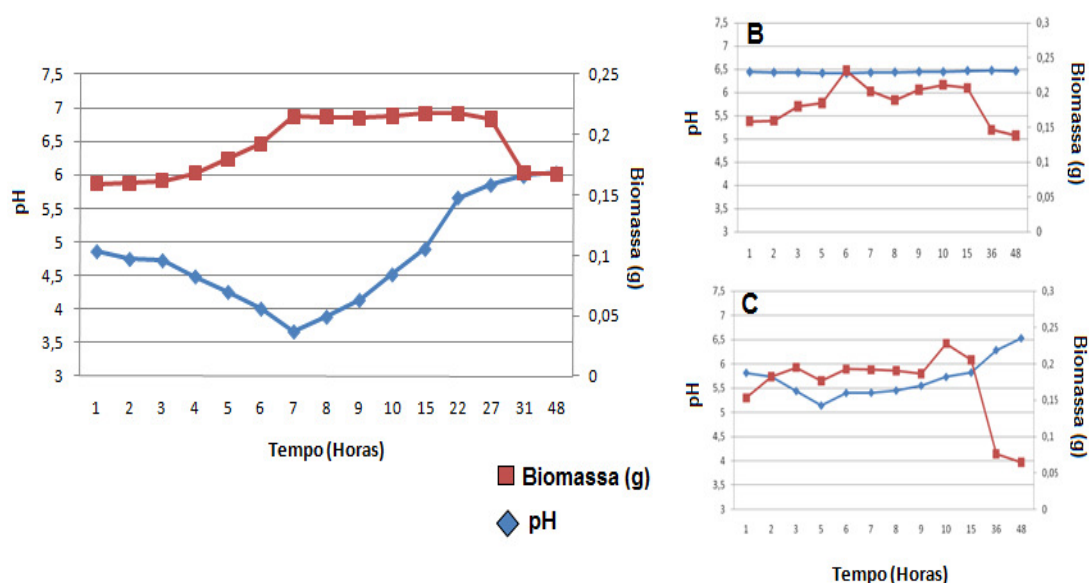


Figura 3.28 - Efeito do pH na determinação da biomassa. Painel A: pH 5,70; Painel B: pH 6,50; Painel C: pH 7,00.

Como pode ser observado no Painel A da Figura 3.28, o pH do meio inicial de 5,70 sofreu um decréscimo para 5,40 após a adição do α -cetoglutarato e do 2,4-D. Com 7 horas de incubação, foi observado o maior valor da biomassa e o menor valor de pH, encontrando-se abaixo de 4,00. Estudos preliminares revelaram que o *Penicillium* não tem capacidade de crescer a pH 4,00, razão pela qual foi observado uma baixa percentagem de degradação do 2,4-D nestas condições. Após as 7 horas o pH voltou a subir para próximo de 6,00 e a biomassa entrou numa fase estacionária até a lise celular nas 48 horas.

No painel B está apresentado os resultados obtidos com a adição de um tampão pH 6,50. Como pode ser observado, não houve variação significativa no pH com o tempo, sendo o pH mantido em torno de 6,50 mesmo após a adição do α -cetoglutarato e do ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Porém, pode-se observar uma variação nos valores da biomassa, sendo o maior valor detectado após 6 horas de incubação, entrando numa fase estacionária com algumas variações até à lise celular. A manutenção do pH do meio permitiu uma maior degradação do herbicida, uma vez que o microrganismo não se encontrava sob stress derivado da acidez do meio.

Já no Painei C, pode-se observar os resultados obtidos com o pH inicial do meio de 7,00, sem estar tamponizado. A adição do α -cetoglutarato e do 2,4-D diminuíram o pH de 7,00 para aproximadamente 5,70, um valor de pH descrito como óptimo para o crescimento dos fungos filamentosos (Deacon, 1997). O menor valor de pH detectado foi após 5 horas de incubação, sendo este valor acima de 5,00. Posteriormente, o valor do pH volta a subir até 6,5 quando se verifica o início da lise celular após 36 horas de incubação. Após o pequeno decréscimo da biomassa, devido provavelmente ao fenómeno de adaptação é detectado um ligeiro aumento sendo mantido até as 10 horas de incubação, quando apresenta um pico máximo. Os valores máximos de biomassa para as condições do pH inicial de 5,60, 6,50 e 7,00 não apresentaram diferenças significativa entre si, no entanto, o perfil da biomassa obtido foi completamente diferente para qualquer uma das condições de pH estudadas, mostrando a versatilidade do fungo em culturas com diferentes pH.

Este estudo apresentou variações no comportamento do microrganismo face a diferentes condições de pH, incluindo uma diferença significativa da capacidade de degradação do 2,4-D entre o pH inicial de 5,70 (18,5%) e as condições com pH inicial de 6,5 (20,0%) e 7,00 (20,5%). Apesar da diferença não ter sido muito significativa entre o pH 7,00 e o pH 6,50, optou-se pelo pH 7,00 pois neste meio não só não foi acrescentado outras substâncias (tampão), bem como foi aquele onde se obteve valores de biomassa mais elevados.

3.7. Optimização da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético pelo *Penicillium chrysogenum* CLONA2

A actividade microbiana é reconhecida como um dos factores mais importantes na eliminação de produtos químicos no ambiente, entre eles os herbicidas. A função dos microrganismos na transformação de herbicidas vem, desde há tempos, sido demonstrada em escala laboratorial, comparando as proporções de degradação dos xenobióticos nas diferentes condições de ensaio (Lichtenstein & Schultz, 1964). Segundo Musumeci (1992), existem alguns factores capazes de inviabilizar ou diminuir a mineralização dos

herbicidas, entre esses factores pode-se citar: I) a inibição da síntese de enzimas capazes de actuar na sua degradação, II) Falta de enzimas adequadas, para a degradação do xenobiótico, III) insolubilidade do composto e, portanto, uma ausência de disponibilidade deste ao ataque do microrganismo, IV) e uma toxicidade excessiva da molécula e/ou seus metabolitos.

Com base nos resultados obtidos em todos os ensaios realizados em cultura submersa, definiu-se os parâmetros que aumentaram o desempenho do *Penicillium* em biodegradar o 2,4-D, entre eles:

- ✓ Concentração inicial de 2,4-D: 40 mg/L
- ✓ concentração salina de 2%;
- ✓ adição de 1 mM de α -cetoglutarato;
- ✓ pH inicial do meio de 7,00;

Com os parâmetros definidos, fez-se os ensaios de optimização da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, donde foram retiradas amostras com intervalo de tempo correspondente às horas, uma vez que a presença do α -cetoglutarato permitiu atingir o valor máximo da biodegradação nas primeiras 24 horas de incubação. A percentagem máxima da degradação do herbicida obtida foi de 21% nas condições descritas acima tendo sido observada nas primeiras 10 horas de incubação a 25 °C e em condições de aerobiose.

O anexo XI apresenta uma tabela adaptada de Vroumsia *et al.*, (2005) com diferentes percentagem de biodegradação do 2,4-D e do 2,4-DCP por várias estirpes de fungos. As estirpes de *Penicillium*: *atramentosum*, *aurantiogriseum*, *chrysogenum*, *cyaneum*, *italicum* e *purpurescens* apresentaram porcentagens de degradação do herbicida inferiores a 8%, incluindo, algumas espécies, onde se observou a ausência da capacidade de biodegradar o herbicida. Em contrapartida, todos apresentaram capacidade de biodegradar o 2,4-DCP, com percentagens muito superiores à degradação do 2,4-D, tendo sido este de 1% para o *P. chrysogenum* estudado.

Dos 85 fungos descrito por Vroumsia e colaboradores, apenas 16% foram capazes de degradar o ácido 2,4-diclorofenoxiacético em percentagens superiores a 25%, em contrapartida, 46% apresentaram capacidade de degradar mais de 25% do 2,4-DCP (Vroumsia *et al.*, 2005).

A Figura 3.29 apresenta um gráfico onde se compara a capacidade de diferentes fungos de degradar o 2,4-D e o 2,4-DCP.

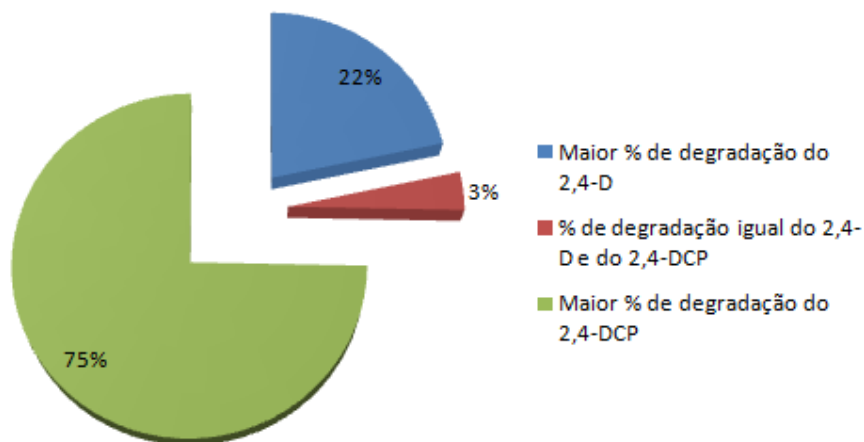


Figura 3.29 - Comparação da degradação do 2,4-D e do 2,4-DCP por diversas estirpes de fungos.

Fonte: Adaptado de Vroumsia *et al.*, (2005)

Como pode ser observado, a maior parte dos fungos descritos na literatura possuem maior capacidade de biodegradar o diclorofenol do que degradar propriamente o 2,4-D. Já o 2,4-diclorofenol apresentou alta toxicidade para o *Penicillium chrysogenum* CLONA2, inibindo o crescimento do microrganismo em meio sólido nas concentrações acima de 10 mg/L, facto que não foi observado para o próprio herbicida.

Considerando que o *Penicillium* tenha capacidade de degradar o herbicida pela mesma via de biodegradação da *Alcaligenes* descrita por Fukumori e Hausinger (1993) e que a presença do α -cetoglutarato acelerou o processo de biodegradação, que corrobora com a presença do gene *tfdA*, possivelmente o *Penicillium chrysogenum* CLONA2 possui alguma deficiência no gene *tfdB*, que é o responsável pela degradação do 2,4-diclorofenol em derivados do catecol. Leitão *et al.* (2007), demonstrou que a estirpe estudada

possui capacidade de metabolizar o fenol via fenol/catecol, ou seja, a presença do metabolito descrito após a degradação do 2,4-DCP não apresenta toxicidade para esta estirpe de *Penicillium*.

Atendendo ao exposto, pode-se cogitar que a toxicidade do 2,4-DCP é o factor limitante para a não continuidade da degradação do herbicida. Nos ensaios realizados, observou-se que a média do herbicida degradado foi de 8 mg/L do herbicida, com uma maior degradação nos ensaios realizados com a adição da sacarose, que permitiu uma degradação de 18 mg/L, possivelmente devido a uma actividade cometabolica capaz de se ajustar à toxicidade do 2,4-DCP.

CAPITULO IV

4. CONCLUSÃO

A capacidade de alguns microrganismos de biodegradar produtos aromáticos em diferentes condições ambientais tem despertado o interesse da comunidade científica para as investigações no ramo da biorremediação.

Os resultados obtidos nos ensaios realizados em meio sólido com diferentes concentrações salinas (0%, 2% e 5,9% de NaCl), mostraram que o *P. chrysogenum* CLONA2 tem capacidade de crescer na presença de até 1000 mg/L do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em ambientes com diferentes concentrações de sais. Com estes resultados, pode concluir-se que o *Penicillium* é tolerante à presença do herbicida, facto que conduziu à realização de ensaios de biodegradação em meio líquido. Em contrapartida, os ensaios realizados em meio sólido com a adição do 2,4-diclorofenol, o principal intermediário descrito na degradação do 2,4-D para microrganismos, inibiu o crescimento do *P. chrysogenum* em concentrações acima de 10 mg/L, ou seja, este possível intermediário da via metabólica de degradação do herbicida exerceu uma toxicidade cem vezes superior ao 2,4-D em meio sólido para a estirpe de *Penicillium*.

Com base nos resultados obtidos em meio sólido, foram realizados ensaios em cultura líquida com meio mínimo mineral suplementado com 100 mg/L de 2,4-D. Como a percentagem de degradação obtida foi de 2%, foram adicionados ao meio mínimo diferentes açúcares (sacarose, lactose e glicose) como fonte de carbono suplementar, onde a sacarose permitiu a melhor degradação após 25 dias de incubação em condições aeróbias. Já quando a concentração de 2,4-D foi reduzida para a metade, observou-se uma degradação de 14% do herbicida em 72 horas, pelo que não se deu continuidade aos ensaios com adição dos açúcares face à baixa eficiência de metabolização do 2,4-D pelo fungo.

A concentração salina do meio mínimo de 2% foi considerada ótima pois permitiu a melhor degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, onde o *Penicillium* degradou aproximadamente 14% do herbicida, tendo sido o maior valor obtido em todas as condições salinas estudadas. A adição conjunta dos co-substratos α -cetoglutarato, manganês e ácido ascórbico permitiu aumentar o desempenho do *P. chrysogenum* na degradação do herbicida, tendo sido observado um aumento de 4% para a condição salina de 2%.

Quando a influência dos co-substratos foi estudada separadamente, observou-se que o α -cetoglutarato permitiu a melhor degradação do herbicida, sendo este co-substrato adicionado nos ensaios posteriores de biodegradação. Os ensaios realizados para verificar a influência de diferentes pHs do meio de cultura permitiram concluir que o pH 7,00 favorece a biodegradação do 2,4-D, bem como permite a obtenção do maior valor de biomassa.

Paralelamente, os resultados obtidos nos ensaios da Carência Bioquímica de Oxigênio (CBO₅), mostraram que o *Penicillium* é capaz de degradar o 2,4-D convertendo parte deste em CO₂, sugerindo que o fungo é capaz de mineralizar pelo menos uma parte do herbicida, eliminando a hipótese do fenômeno de adsorção a 100% do 2,4-D pelas hifas, facto que ocorre em vários fungos filamentosos com diversos compostos, entre eles compostos fenólicos e metais pesados. Nestes ensaios, o α -cetoglutarato foi o co-substrato que permitiu uma maior mineralização do 2,4-D, sendo coerente com os resultados obtidos para degradação do 2,4-D em cultura submersa.

O presente trabalho permitiu otimizar um meio de cultura capaz de degradar 21% do 2,4-D, face à condição salina de 2%, a pH inicial de 7,00 e com a adição de 1mM do α -cetoglutarato. Os resultados do CBO₅ e os picos dos intermediários observados nos cromatogramas sustentaram apoiam os resultados obtidos em cultura submersa, indicando que a diminuição da concentração do herbicida nas análises cromatográficas é devido à degradação do 2,4-D.

Portanto, os ensaios realizados mostraram que o *P. chrysogenum* CLONA2 tem capacidade de biodegradar o ácido 2,4-diclorofenoxiacético, podendo desempenhar um papel ecológico importante na degradação e mineralização do herbicida no meio ambiente.

4.1. PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

Por limitação de tempo não foi possível determinar a via metabólica envolvida na degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético pelo *Penicillium chrysogenum*. Deste modo, e na sequência do trabalho realizado, considera-se interessante estudar os seguintes pontos:

- ✓ identificação dos intermediários presentes na degradação do 2,4-D;
- ✓ identificação dos genes envolvidos na via metabólica de degradação do herbicida;
- ✓ definir as vias de degradação do herbicida para as diferentes concentrações salinas estudadas;

Considerando a taxa de degradação de 21% do 2,4-D obtida em menos de 24 horas em culturas submersas e sabendo que o *Penicillium* é capaz de crescer em meio sólido na presença de 1000 mg/L do herbicida, seria interessante averiguar qual é a sua eficiência de degradação do 2,4-D num solo contaminado.

REFERÊNCIAS

- Adams, D. C. e Watson, L. T. (1996). *Treatability of s-triazine herbicide metabolites using powder activated carbon*. Journal of Environmental Engineering. Vol.39, pp.327-330.
- Adriaens, P. e Focht, D. D. (1991). *Cometabolism of 3,4-dichlorobenzoate by Acinetobacter sp. Strain4-CB1*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 57, nº1, pp. 173-179.
- Aguiar, A. e Ferraz, A. (2007). *Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro*. Revista Química Nova. Vol. 30, nº 3, pp. 623-628.
- Alam, J. B.; Dikshit, A. K. e Bandyopadhyay, M. (2000). *Efficacy of adsorbents for 2,4-D and atrazine removal from water environment*. Global NEST Journal Int. Vol.2, nº2, pp.139-148.
- Alexander, M. e Aleem, M. J. H. (1961). *Effect of chemical structure on microbial decomposition of aromatic herbicides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. pp. 9-44.
- Alexander, M. (1981). *Biodegradation of Chemicals of Environmental Concern*. Science. Vol.21, pp.132-138.
- Alexander, M. (1985). *Biodegradation Organic of Chemical*. Environmental Science Technology. Vol. 18, nº2, pp.106-11.
- Allard, A. e Neilson, A. H. (1997). *Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects*. International Biodeterioration and Biodegradation. Vol.39, nº4, pp.253–285.

Aly, O. M. e Faust, S. D. (1965). *Removal of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid derivates from natural waters*. Journal AWWA. pp.221-230.

Amarante, O. P. Jr.; Brito, N.M.; Santos, T. C. R.; Nunes, G. S. e Ribeiro, M.L. (2003). *Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis*. Talanta. Vol.60, pp.115-121.

Amy, P.S.; Schulke, J.W.; Frazier, L.M. e Seidlert, R.J. (1985). *Characterization of Aquatic Bacteria and Cloning of Genes Specifying Partial Degradation of 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 49, nº 5, pp. 1237-1245.

Atterby, H.; Smith, N.; Chaudhry, Q. e Stead, D. (2002). *Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminated environments*. Journal Pesticide Outlook, Royal Society of Chemistry. pp 9-13.

Baelum, J.; Henriksen, T.; Hansen, H.C.B. e Jacobsen, C.S. (2006). *Degradation of 4-Chloro-2-Methylphenoxyacetic Acid in Top- and Subsoil Is Quantitatively Linked to the Class III tfdA Gene*. Applied and Environmental Microbiology. Vol.72, nº2, pp.1476-1486.

Baelum, J.; Jacobsen, C.S. e Holben, W.E. (2010). *Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional tfdA gene distribution in thirty-one different 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders*. System Applied Microbial. Vol.33, pp.67-70.

Barnett, H. L. e Hunter, B. B. (1999). *Illustrated genera of imperfect fungi*. In: The American Phytopathological Society, fourth ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 218.

Bedard, D. L. e Haberl, M. L. (1990). *Influence of chlorine substitution pattern on the degradation of polychlorinated biphenyls by eight bacterial strains*. Journal Microbial Ecology. Vol.20, pp.87-102.

Bell, G. R. (1960). *Studies on a soil Achromobacter which degrades 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*. Journal Can. Microbial. Vol.6, pp.325.

Bennett, J. W.; Wunch, K. G. e Faison, B. D. (2002). Use of fungi biodegradation. Manual of Environmental Microbiology, 2ªed. Cap. 87, pp. 960-971.

Bernard, H.; Chabalier, P. F.; Chopart, J. L.; Leqube, B. e Vauclin, M. (2005). *Assessment of herbicide leaching risk in two tropical soils of Reunion island (france)*. Journal of Environmental Quality. Vol.2, nº 34, pp.53-54.

Birmingham, B. C. e Colman, B. (1985): *Persistence and fate of 2,4-D butoxyethanol ester in artificial ponds*. Journal of Environmental Quality. Vol.14, pp.100-104.

Boivin, A.; Amellab, S.; Schiavon, M. e Genuchten, M. T.V. (2005). *2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils*. Journal Environmental Pollution. Vol.138, pp.92-99.

Bolan, N. S. e Baskaran, S. (1996). *Biodegradation of 2,4-D Herbicide as Affected by its Adsorption -Desorption Behavior and Microbial Activity of Soils*. Journal Soil Research. nº 34, pp. 1041-1053.

Bollag, J. M. e Liu, S. Y. (1990). *Biological transformation process of pesticides*, In: Chend, H.H (Ed.) *Pesticides in the soil environment: Process, impacts and modeling*. Madison: Soil Science Society of America, pp.169-211.

Boopathy, R. (2000). *Review: Factors limiting bioremediation technologies*. Bioresource Technology. Vol.74, pp.63-67.

Borja, J.; Taleon, D. M.; Auresenia, J. e Gallardo, S. (2005). *Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. Process Biochemistry*. Vol. 40, pp. 1999-2013.

Campos, S. X. e Vieira, E. M.(2002). *Estudo da degradação do herbicida ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) por meio da radiação gama do cobalto-60 em solução aquosa contendo ácido húmico*. Revista Química Nova. Vol.25, nº4, pp. 529-532.

Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M. e Neves, M. C. P. (1992). *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. pp.341-360.

Carney, M. (1991). *European drinking water standards*. Journal AWWA, Vol. 83, pp. 48-55.

Carvalho, J.J.F. (1995). *A produção de alimentos e o problema da segurança alimentar*. Revista Estudos Avançados. Vol.9, nº 24, pp. 173-193.

Castro, A. G. (1989): *Defensivos agrícolas como um fator ecológico*. Revista EMBRAPA-CNPDA. Documento nº 6, pp. 20.

Cattaneo, R. (2009). *Parâmetros metabólicos e histológico de Jundiás (Rhamdia quelen) expostos a formulação comercial do herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)*. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria-RS.

Cederlund, H., Börjesson, E., Öneby, K. and Stenström, J. (2007). *Metabolic and cometabolic degradation of herbicides in the fine material of railway ballast*. Soil Biology & Biochemistry. Vol. 39, nº 2, pp. 473-484.

Cerdeira, A.; Pessoa, M. C. P. Y.; Bonato, P. S.; Queiroz, R. H.C. e Lanchonete, V.L. (2002). *Metodologia analítica de resíduos do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) em amostras de água em área de cultivo de cana-de-açúcar*. Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba. Vol. 12, pp-99-110.

Chaudhry, G. R. e Huang, G. H. (1988). *Isolation and characterization of a new plasmid from a Flavobacterium sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate*. Journal Bacteriology. Vol.170, pp. 3897-3902.

Chaudhry, M. Q.; Schroeder, P.; Werck-Reichhart, D.; Grajek, W. e Marecik, R. (2002). *Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment*. Environmental Science and Pollution Research, Vol.9, nº 1, pp. 4–17.

Chao, Y.F.; Lee, J. J. e Wang, S.L. (2009). *Preferential adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid from associated binary-solute aqueous systems by Mg/Al-NO₃ layered double hydroxides with different nitrate orientations*. Journal Hazardous Materials. Vol.165, pp.846-852.

Chend, H.H (1990). *Pesticides in the soil environment: Process, impacts and modeling*. Ed. Soil Science Society of America, pp.169-211.

Chinalia, F.A. e Killham, K.S. (2006). *2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biodegradation in rivers sediments of Northeast-Scotland and its effect on the microbial communities (PFLA and DGGE)*. Chemosphere. Vol.64, pp.675-1683.

Chong, N.M. e Chang, H.W. (2009). *Plasmid as a measure of microbial degradation capacity for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*. Bioresource Technology. Vol.100, pp.1174-1179.

Chu, J. P. e Kirsch, E. J. (1972). *Metabolism of PCP by axenic bacterial culture*. Journal Applied Microbiology. Vol. 23, pp.1033-1035.

Collins, C. H.; Braga, G. L. E Bonato, P. S. (1993). *Introdução a métodos cromatográficos*. Livro: Cromatografia líquida de alta eficiência. 5ª ed. Campinas, SP. pp. 179 - 243.

Cook, A.M.; Grossenbacher, H. e Hotter, R. (1983). *Isolation and cultivation of microbes with biodegradative potential*. Experientia. Vol.39, pp. 1191-1198.

Coutinho, C.; Tanimoto, S.; Galli, A.; Garbellini, G.; Takayama, M.; Amaral, R.; Mazo, L.; Avaca, L. e Machado, S. (2006). *Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez*. Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente. Vol.15, pp. 65-72.

Cox, L., Walker, A., e Welch, S.J. (1996). *Evidence for the accelerated degradation of isoproturon in soils*. Pesticide Science. Vol.48, pp. 253-260.

Cox, P. W.; Paul, G. C. e Thomas, C. R. (1998). *Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms*. Journal Microbiology. Vol.144, pp. 817- 827.

Crespin, M.A.; Gallego, M. e Valcarcel, M. (2001). *Study of the degradation of the herbicides 2,4-D and MCPA at different depths in contaminated agricultural soil*. Environmental Science Tecnology. Vol.35, nº 21, pp. 4265-4270.

Cronenberg, C.C.H.; Ottengraf, S.P.P.; van den Heuvel, J.C.; Pottel, F.; Sziele, D.; Schügerl, K.; Bellgardt, K.H. (1994). *Influence of age and structure of *Penicillium chrysogenum* pellets on the internal concentration profiles*. Bioprocess Engineering. Vol.10, pp. 209-216.

Dalton, H. e Stirling, D. I. (1982).Co-metabolism.Journal Royal Society of London. Vol. 297, pp. 481–496.

Daugherty,D. D. e Karel, S. F. (1994). *Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Pseudomonas cepacia* DBO1(pRO101) in a dual-substrate chemostat*. Applied Environmental Microbiology. Vol.60, pp.3261-3267.

Deng, S.; Ma, R.; Yu, Q.; Huang, J. e Yu, G. (2009). *Enhanced removal of pentachlorophenol and 2,4-D from aqueous solution by and aminated biosorbent*. Journal Hazardous Materials. Vol.165, pp.408-414.

Ditzelmuller, G.; Loidl, M. e Streichsbier, F. (1989). *Isolation and characterization of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil bacterium*. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol.31, pp.93-96.

Don, R. H. e Pemberton, J. M. (1981). *Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from Alcaligenes paradoxus and Alcaligenes eutrophus*. Journal Bacteriology. Vol.145, pp.681-686.

Donnelly, P. K.; Entry, J. A. e Crawford, D. L. (1993). *Degradation of Atrazine and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by Mycorrhizal Fungi at Three Nitrogen Concentrations*. Applied Environmental Microbiology. Vol. 59, nº 8, pp. 2642-2647.

Dubus, I. G.; Hollis, J. M.; Brown, C. D. (2000). *Pesticides in rainfall in Europe*. Journal Environmental Pollution. Vol. 110, pp. 331–344.

Duxbury, J. M. (1970). *2,4-D metabolism: enzymatic conversion of chloromaleylacetic Kid to succinic acid*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol.18, pp.199-201.

Eichhorn, E.; Ploeg, J. R. D.; Kertesz, M. A. e Leisinger, T. (1997). *Characterization of a Ketoglutarate-dependent Taurine Dioxygenase from Escherichia coli**. Journal of Biological Chemistry. Vol. 272, nº 37, pp. 23031-23036.

Ellis, L. B.; Roe, D.; Wackett, L. P. (2006). *The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation database: The First Decade*. Nucleic Acids Research, Vol.34, pp.17-21.

Entry, J. A.; Donnelly, P. K e Emminham, W. H. (1994). *Microbial mineralization of atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in riparian pasture and forest soils*. Biology and Fertility of Soils. Vol.18, pp. 89-94.

EPA (1980). *Ambient water Quality criteria for 2,4-dichlorophenol*. Office of water Regulation and standards, EPA 440.

EPA, (2005). *Consumer Factsheet on: 2,4 D*. Office of water Regulation and standards.

Fava, F.; Armenant, P. M. e Kafkewitz, D. (1995). *Influence of organic and inorganic growth supplements on the aerobic biodegradation of chlorobenzoic acids*. Applied Microbiology Biotechnology. Vol.43, pp.171-177.

Feldmann, R. J.; Maibach, H. I. (1974). *Percutaneous Penetration of Pesticides and Herbicides in Man*. Toxicology and Applied Pharmacology Vol.28, pp 126-132.

Fernley, H. N. e Evans, W. C. (1959). *Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by soil pseudomonas*. Process Biochemistry Sot. Vol. 73, pp. 228-230.

Ferreira, F. A.; Silva, A. A. e Ferreira, L. R. (2005). *Mecanismo de ação dos herbicidas*. Congresso brasileiro de algodão, Salvador-BA, Brasil.

Forno, R. G. D. (2006). *Avaliação da poluição do solo por derivados de petróleo e sua remediação*. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Federal do Paraná. Paraná-PR.

Frumkin, H. (2003). *Agent orange and Cancer: An Overview for clinicians*. Environmental Carcinogens, Vol. 153, nº 4, pp. 245-255.

Fukumori, F. e Hausinger, R. P. (1993). *Alcaligenes eutrophus JMP134: "2,4-dichlorophenoxyacetate moxygenase" Is an α -Ketoglutarate-dependent dioxygenase*. Journal of Bacteriology. Vol.175, nº 7. pp. 2083-2086.

Fukumori, F. e Hausinger, R. P. (1993a). *Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase*. Journal Biological Chemistry. Vol. 268, nº32, pp. 24311-24317.

Ghassemi, M.; L. Fargo, P.; Painter, S.; Quinlivan, R.; Scofield e A. Takata. (1981). *Environmental Fates and Impacts of Major Forest Use Pesticides*. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances. pp. 101-148.

Gibson, S. A. e Suflita, J. M. (1990). *Anaerobic Biodegradation of 2,4,5 Trichlorophenoxyacetic Acid in Samples from a Methanogenic Aquifer: Stimulation by Short-Chain Organic Acids and Alcohols*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 56, nº 6, pp. 1825-1832.

Gomes, M. A. F; Souza, M. D.; Boeira, R. C. e Toledo ,L. G. (2000). *Nutrientes Vegetais no Meio Ambiente: ciclos biogeoquímicos, fertilizantes e corretivos*. Revista Embrapa meio ambiente.Documento 66.

Gonzales, I. R.; Leal, E. R.; Cerrato, R. F.; Garcia, F. E.; Seijas, N. R. e Poggi-Varaldo, H. M. (2006). *Bioremediation of a mineral soil with high contents of clay and organic matter contaminated with herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid using slurry bioreactors: Effect of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source*. Process Biochemistry. Vol. 41, pp.1951-1960.

Govlev, E. L. (1978). *Metabolism in Nocardia and actinomycetes*. Actinomycetes, Vol. 13, pp. 59-101.

Grady, C. P. L. (1985). *Biodegradation: its measurement and microbiological basis*. Journal Biotechnology & Bioengineering. Vol.27, pp.660-674.

Grant, R. J. (2001) *A bioassay for the measurement of insecticide concentration*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Vol.41, pp. 319-324.

Grant, R. J. e Betts, W. B. (2001). *Biodegradation of synthetic pyrethroid insecticides in formulated compounds*. Biological Treatment Technologies. Vol.41, pp. 27–34.

Grant, R. J., Daniell, T. J. e Betts, W. B. (2002). *Isolation and identification of synthetic pyrethroid degrading bacteria*. Journal of Applied Microbiology. Vol. 92, pp. 534-540.

Grant, R. J. e Betts, W. B. (2003). *Biodegradation of cypermethrin SP in used sheep dip*. Journal Applied Microbiology. Vol. 36, pp. 173-176.

Grant, R. J. e Betts, W. B. (2004). *Mineral and carbon usage of two synthetic pyrethroid degrading bacterial isolates*. Journal Applied Microbiology. Vol. 97, pp. 656-662.

Grover, R. (1977). *Mobility of Dicamba , Picloram, and 2,4-D in Soil Columns*. Weed Science. Vol. 25, pp. 159- 162.

Guedes, S. F.; Leitão, A. L. e Mendes, B. (2009). *Fungal diversity and environmental herbicides remediation*. World Congress ISWA/APESB: Turning wast into ideas. pp.199.

Han, S. O. e New, P. B. (1994): *Effect of Water Availability on Degradation of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by Soil Microorganisms*. Soil Biology and Biochemistry. Vol. 26, nº 12, pp. 1689-1697.

Harder, W. e Dijkhuizen, L. (1982). *Strategies of mixed substrate utilization in microorganisms*. Journal of the Royal society of London B. Vol.297, pp.459–480.

Harris, S. A e Solomon, K. R. (1992). *Human Exposure to 2,4-D Following Controlled Activities on Recently Sprayed Turf*. Journal of Environmental Science and Health, Vol. 27, nº1, pp. 9-22.

Hausinger, R. P e Fukumori, F. (1995). *Characterization of the first enzyme in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid metabolism*. Journal Environmental Health Perspectives. Vol.103, pp.37-39.

- Hawkins, A. C. e Harwood, C. S. (2002). *Chemotaxis of Ralstonia eutropha JMP134(pJP4) to the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetate*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 68, nº2, pp.968-972.
- Heon, K. e Tuovinen, O. H. (1990). *Degradation of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid by mixed cultures of bacteria*. Journal Industrial Microbiology. Vol.6, pp.275-278.
- Heon, K. e Tuovinen, O. H. (1991). *Bacterial degradation of phenoxy herbicide mixtures 2,4-D and MCPP*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol.47, pp.222-229.
- Hermosin M. C. e Cornejo, J. (1991). *Soil Adsorption of 2,4-D as Affected by the Clay Minerology*. Toxicology and Environmental Chemistry. Vol. 31, pp. 69-77.
- Hillel, D. (1982). *Introduction Into Soil Physics*. Academic Press, San Diego CA. pp.312.
- Horvath, R. S. (1972). *Microbial Co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature*. Bacteriological Reviews. Vol. 36, nº 2, pp. 146-155.
- Howard, P. P. (1991): *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals*. Pesticides. Lewis Publishers. Vol.3, pp.712.
- Ivey, F. D.; Hodge, P. N.; Turner, G. E. e Borkovic, K. A. (1996). *The Gai Homologue gna-1 Controls Multiple Differentiation Pathways in Neurospora crassa*. Molecular Biology of the Cell. Vol. 7, pp. 1283-1297.
- Janke, D. e Fritsche, W. (1985). *Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics*. Journal of Basic Microbiology, Vol. 23, pp. 603-619.

Jonatan, T. (1989). *Introduction of environmental studies*. 3rd ed.: Saunders College, New York. pp. 304.

Junior, F. M. R. S. e Pereira, S. V. (2007). *Ecologia e fisiologia de fungos filamentosos isolados de solo contaminados com metais pesados*. Revista Brasileira de Biociência de Porto Alegre. Vol. 5, pp. 903-905.

Junior, J. L. S. G. V. (2007). *Bioinformática aplicada no desenho de iniciadores para genes funcionais- degradação do herbicida 2,4-D: Um estudo de caso*. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ.

Kearney, P. C., e Kaufman, D. D. (1975). *Herbicides: Chemistry, degradation, and mode of action*. Marcel Dekker, New York. pp.384.

Kelly, M. P.; Hallberg, K. B. e Tuovinen, O. H. (1989). *Biological degradation of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid: Chloride mass balance in stirred tank reactors*. Applied Environmental Microbiology. Vol.55, nº 10, pp. 2717-2719.

Kitagawa, W.; Takami, S.; Miyauchi, K.; Masai, E.; Kamagata, Y.; Tiedje, J. M. e Fukuda, M. (2002). *Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic Bradyrhizobium sp. strain HW13 isolated from a pristine environment*. Journal Bacteriology. Vol.184, pp. 509-518.

Knop, D. (1994). *Assessment of exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the chemical industry: results of a five year biological monitoring study*. Occupational and Environmental Medicine. Vol 51, pp.152-159.

Koike, O. C. R. (2007). *Caracterização do estado de contaminação por organoclorados em água, sedimento e ostras do compelho Estuarino da Baía de Paranaguá (Paraná-Brasil)*. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande do Norte, RN.

- Leadbetter, E. R. e Foster, J. W. (1959). *Oxidation products formed from gaseous alkanes by the bacterium Pseudomonas methanica*. Archives of Biochemistry and Biophysics of San Diego, Vol.82, pp. 491-492.
- Leitão, A. L.; Duarte, M. P. e Oliveira, J. S. (2007). *Degradation of phenol by a halotolerant strain Penicillium chrysogenum*. International Biodeter Biodegradation. Vol. 59, pp. 220-225.
- Leitão, A. L. (2009). *Potential of Penicillium species in the bioremediation field*. International Journal of Environmental Research and Public HealthInt. Vol. 6, 1393-1417.
- Leitenberg, M. (2001). *Biological Weapons in the Twentieth Century: A Review and Analysis*. Critical Review Microbiology. Vol.27, pp. 267-320.
- Lilienfeld, D. E., e Gallo, M. (1989). 2,4-D, 2,4,5-T, and 2,3,7,8-TCDD: An Overview. Epidemiologic Reviews. Vol.11, pp. 19-58.
- Limbert, E. S. B. e Betts, W. B. (1994). *Biodegradation of trace levels of a complex organic pollutant mixture*. Journal microbios Vol. 78, pp. 237–243.
- Lin, A. H.; Lerch, R. N.; Garret, H. E. e George, M. F. (2008). *Bioremediation of Atrazine-Contaminated Soil by Forage Grasses: Transformation, Uptake, and Detoxification*. Journal Environmental Quality. Vol. 37, pp. 196-206.
- Litchfield, C. (2005). *Thirty years and counting: bioremediation in its prime?* BioScience. Vol. 55, nº 3, pp. 273- 279.
- Lichtenstein, E. P. e Schultz, K .R. (1964). *The effects of moisture and microorganisms on the persistence and metabolism of some organophosphorus insecticides in soils, with special emphases on parathion*. Journal of Economic Entomology, Vol. .57, pp.618-627.

Loos, M. H. (1967). *Phenoxyacetate herbicide detoxication by bacterial enzymes*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. Vol.15, pp. 858-860.

McGowan, C.; Fulthorpe, R.; Wright, A. e Tiedje, J. M. (1998). *Evidence for Interspecies Gene Transfer in the Evolution of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degraders*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64, nº 10, pp.4089-4092.

Macrae, I. C. (1963). *The decomposition of 4-(2,4-dichlorophenoxybutyric) acid by Flavobacterium sp.* Journal General Microbiology. Vol. 32, pp.69-76.

Mangat, S. S. e Elefsiniotis, P. (1999). *Biodegradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in sequencing batch reactors*. Water Research.Vol.33, nº 3, pp. 861-869.

Margesin, R. e Schinner, F., (2001). *Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology*. Extremophiles Vol. 5, pp. 73–83.

Margonato, F. B.; Batista, M. R.; Baroni, E. A. (2002). *Efeito do agrotóxico 2,4-D (ácido 2,4-diclorfenoxiacético) na morfologia e função renal de ratos Wistar*. XI Encontro Anual de Iniciação Científica. Maringá-PR, Brasil.

Mariano, A. P. (2006). *Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminadas com óleo diesel*. Tese apresentada para obtenção do título de doutor na Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP.

Matheus, D. R. (2003). *Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais*. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor pela Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP.

Miligi, L.; Costantini, A. S.; Veraldi, A.; Benvenuti, A., e Vineis, P. (2006). *Cancer and pesticides: an overview and some results of the Italian multicenter*

case-control study on hematolymphopoietic malignancies. Ann N.Y Academy Science. Vol. 1076, pp. 366-377.

Moraes, S. G. (1995). *Fotodegradação de Compostos Organoclorados Aromáticos: Caracterização e Toxicidade de Intermediários*. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade de Campinas. Campinas-SP.

Moraes, S. L.; Santana, C. G. e Rezende, M. O. O. (2004). *Comportamento de pesticidas em águas de diferentes composição química*. Revista analytica, Vol 9, pp. 42-47.

Mulbry, W. e Kearney, P. C. (1991). *Degradation of pesticides by microorganisms and the potential for genetic manipulation*. Crop Protection 10, pp. 334–346.

Muller, R. H. (2007). *Activity and Reaction Mechanism of the Initial Enzymatic Step Specifying the Microbial Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetate*. Journal Engineering in Life Sciences. Vol.7, nº 4, pp. 311–321.

Musumeci, M. R. *Defensivos agrícola e sua interação com a microbiota do solo*. In: Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M. e Neves, M. C. P. (1992). *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. pp.341-360.

Nakagawa, L. E. (2003). *Alteração de características do solo para remoção de hexaclorobenzeno de área contaminada*. Tese apresentada para obtenção do título de doutor na Universidade de São paulo. São Paulo–SP.

Nakamura, S.; Okumura, K. e Masahiro, Y. (2008). *Axionic mirage mediation*. Journal Physical Review D. Vol.77, 1-18.

Neely, W. B. (1994): *Introduction to chemical exposure and risk assessment*. Boca Raton: Lewis Publishers/CRC Press. pp. 190.

Nickel, K.; Suter, M. J. F.; Kohler, H. P. E. (1999). *Involvement of two α -ketoglutarate-dependent dioxygenases in enantioselective degradation of (R)- and (S)-mecoprop by *Sphingomonas herbicidovorans* MH*. Journal Bacteriology. Vol.179, pp. 6674–6679.

Papagianni, M. (2004). *Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes*. Journal Biotechnology Advance. Vol. 22, nº3, pp. 189-259.

Papanastasiou, A. C e Maier, W. J. (1982). *Kinetics of biodegradation of 2,4-dichlorophenoxy-acetate in the presence of glucose*. Journal Biotechnology & Bioengineering. Vol. 24, pp. 2001-2011.

Paraíba, L. C.; Barreto, A. J. e Perez, V. (2005). *Estimativa da superfície específica de solos e do coeficiente de sorção de pesticidas*. Revista Embrapa Meio Ambiente. pp.18-18.

Paris, D. F. e Lewis, D. L. (1973). *Chemical and microbial degradation of 10 selected pesticides in aquatic systems*. Residue Review. Vol.45, pp. 95-124.

Pitt, J. I. (1979). *The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces**. Academic Press, London, UK, pp. 634.

Prata, F. e Lavorenti, A. (2000). *Comportamento de herbicidas no solo: Influência da matéria orgânica*. Revista Biociência. Vol.6, nº 2, p.17-22.

Rice, C. P. (1996). *Pesticides in fogwater*. Journal Pesticide Outlook Vol. 7, nº 2, pp. 31–36.

Riviero, M. G. e Pérez, M. R. P. (2008). *Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos*. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol.7, nº 1, pp- 1-12.

Rodier, J. (1981). Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. pp.1059-1061.

Rosa, M. D. A. (2009). *Os fungos na escola: análise dos conteúdos de micrologia em livros didáticos do ensino fundamental de Florianópolis*. Monografia apresentada para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Florianópolis-SC.

Ryan, T. P. e Bumpus, J. A. (1989). *Biodegradation of 2,4,5 trichlorophenoxyacetic acid in liquid culture and in soil by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology Biotechnology. Vol. 31, pp.302-307.

Saari, R. E. e Hausinger, R. P. (1998). Ascorbic acid-dependent turnover and reactivation of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid/ α -ketoglutarate dioxygenase using thiophenoxyacetic acid. Biochemistry. Vol.37, pp.3035-3042.

Saari, R. E.; Hogan, D. A. e Hausinger, R. P. (1999). *Stereospecific degradation of the phenoxypropionate herbicide dichlorprop*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 6, pp. 421–428.

Sanches-Brunete, C.; Pérez, S.; Tadeo, J. L. (1991). *Determination of phenoxy ester herbicides by gas and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography, Vol. 522, pp. 235-240.

Schreiber, F. (2006). *Comparison of Metabolic Pathways using Constraint Graph Drawing*. Conferences in Research and Practice in Information Technology, Vol.19, pp.105-110.

Shaw, L. J. e Burns, R. J. (2004). *Enhanced Mineralization of [U-14C]2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Soil from the Rhizosphere of Trifolium pratense*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 70, nº 8, pp.4766-4774.

Shimojo, M.; Kawakami, M. e Amada, K. (2009). *Analysis of genes encoding the 2,4- dichlorophenoxyacetic acid-degrading enzyme from Sphingomonas agrestis 58-1*. Journal Bioscience and Bioengineering. Vol. 108, nº1, pp. 56-59.

Short, P. L. (2005). *Growing agchem R&D*. Chemical And Engineering News. Vol. 83, pp. 19–23.

Silva, J. F e Monteiro, R. T. R. (2000). *Degradação de xenobióticos por fungos filamentosos isolados de areia fenólica*. Revista Brasileira de Ciências do Solo. Vol. 24, pp. 669-674.

Silva, C. M. M. S. e Fay, E. F. (2003). *Impacto ambiental do regulador de crescimento vegetal paclobutrazol*. Revista Embrapa Meio Ambiente. Documento nº 30, pp.71-79.

Silva, T. M.; Stets, M. I.; Mazzetto, A. M.; Andrade, F. D.; Pileggi, A. V.; Fávero, P. R.; Cantú, M. D.; Carrilho, E.; Carneiro, P. I. B. e Pileggi, M. (2007). *Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil*. Journal Microbiology. Vol. 38, pp. 522-525.

Silva, H. H. B.; Schneider, A. L. S.; Wisbeck, E. e Furlan, S. A. (2009). *Biodegradation of 2, 4 dichlorophenol by Pleurotus ostreatus DSM 1833*. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol. 52, nº 56, pp.1563-1570.

Silva, R. R. (2009). Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores. Tese apresentada para obtenção do título de doutor no Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo-SP.

Skoog, D. A.; West, D. M. e Holler, F. J. (1996). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 7th Ed., Saunders College Pub., USA. pp.870.

Smejkal, C. W.; Seymour, F. A.; Burton, S. K. e Lappin-Scott, H. M. (2003). *Characterisation of bacterial cultures enriched on the chlorophenoxyalkanoic*

acid herbicides 4-(2,4-dichlorophenoxy) butyric acid and 4-(4-chloro-2-methylphenoxy) butyric acid. Journal Industrial Microbiology and Biotechnology. Vol. 30, pp. 561-567.

Smith, B.; Coulson, G. E. e Morris, G. J. (1986). *A Comparative Study of the Morphology and Viability of Hyphae of Penicillium expansum and Phytophthora nicotiarum during Freezing and Thawing*. Journal of General microbiology. Vol. 132, pp. 2013-2021.

Souza, J. A. (1999). *Estudo da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético em formulações de liberação controlada*. Tese apresentada para obtenção do título de doutora na Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

Spadotto, C. A.; Gomes, M. A. F.; Luchini, L. C. e Andrea, M. M. (2004). *Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações*. Embrapa Meio Ambiente. Documento nº 42. pp.29.

Spadotto, C. A; Matallo, M.; Gomes, M. (2005). *Sorção do herbicida 2,4-D em solos brasileiros*. Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente. Vol. 13, pp.103-110.

Standard Methods (1985). *For the examination of water and wastewater*. 16th. edition. APHA, AWWA and WPCF. pp.525-527.

Stearman, G. Kim e Wells, M. J. M. (1997). *Leaching and Runoff of Simazine, 2,4-D, and Bromide from Nursery Plots*. Journal of Soil and Water Conservation. Vol. 52, pp.137-144.

Steenson, T. I. e Walker, N. (1957). *The pathway of breakdown of 2,4-dichloro- and 4-chloro-2-methylphenoxyacetate by bacteria*. Journal of General Microbiology. Vol 16, pp. 146-146.

Tauchert, E. (2006). *Degradação de espécies organocloradas por processos avançados envolvendo ferro metálico*. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR.

Tamma-Vithala, R. V. (1989). *Photodegradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Soil*. Unpublished study. Artment of Pesticide Regulation. Sacramento, CA. pp.37-40.

Thompson, J. E. (2004). *Practical Guide to Contemporary Pharmacy Practice*. 2^a ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins.

Tiedje, J. M.; Duxbury, J. M.; Alexander, M., e Dawson, J. E. (1969). *2,4-D metabolism: pathway of degradation of chlorocatechols by Arthrobacter sp.* Journal Agriculture Food and Chemistry. Vol. 17, pp. 1021-1026.

Tretter, L. e Adam-Vizi, V. (2005). *Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. Vol. 360, pp. 2335-2345.

Trillas, M.; Peral, J. e Doménich, X. (1996). *Photocatalyzed Degradation of Phenol, 2,4-Dichlorophenol, Phenoxyacetic Acid and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid over Supported TiO₂ in a Flow System*. Journal Chemistry Technology and Biotechnology. Vol. 67, pp.237-242.

Veeh, R. H.; Inskeep, W. P. e Camper, A. K. (1996). *Soil Depth and Temperature Effects on Microbial Degradation of 2,4-D*. Journal of Environmental Quality. Vol. 25, pp. 5-12.

Vieira, E. M.; Prado, A. G. S.; Landgraf, M. D. e Rezende, M. O. O. (1999). *Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4d) em solo na ausência e presença de matéria orgânica*. Revista Química Nova. Vol. 22, nº3, pp. 305-308.

Vroumsia, T.; Steiman, R.; Seigle-Murandi, F. e Benoit-Guyod, J. L. (2005). *Fungal bioconversion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP)*. Chemosphere. Vol. 60, pp. 1471-1480.

Waite, D. T.; Cessna, A. J.; Grover, L. A. e Snihura, A. D (2002). *Environmental concentrations of agricultural herbicides: 2,4-D and Triallate*. Journal of Environmental Quality, Vol. 31, pp. 129-144.

Wackett, L. P.; Sadwosky, M. J.; Newman, L. M.; Hur, H. G. e Li. S. (1994). *Metabolism of polyhalogenated compounds by a genetically engineered bacterium*. Nature. Vol.368, pp. 627–629.

Walker, A. E.; Holman, R. E. e Leidy, R. B. (2000). *ELISA and GC/MS analysis of pesticide residues in North Carolina*. Journal of the American Water Resources Association. Vol. 36, pp. 67-74.

Westendorf, A.; Müller, R. H. e Babel, W. (2003). *Purification and characterization of the enantiospecific dioxygenases from Delftia acidovorans MC1 initiating the degradation of phenoxypropionate and phenoxyacetate herbicides*. Acta Biotechnologica. Vol 23, nº 1, pp. 3–17.

Yadav, J. S. e Reddy, C.A. (1993). *Mineralization of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and Mixtures of 2,4-D and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid by Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 59, nº 9, pp. 2904-2908.

OUTRAS FONTES

Legislação e portarias

Brasil. (2000). *Norma de qualidade de água para consumo humano*. Ministério da Saúde. Portaria nº. 1469, de 29 dezembro de 2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2 jan. de 2001. Secção 1, pp. 19-23.

Associação Brasileira de Normas Técnicas-ABNT, (2004). Resíduos sólidos: Classificação. Número de referência: ABNT NBR 10004:2004.

Sites:

California Department of pesticide regulation. Consultado dia 26 de abril de 2010. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/epa/m2.htm>>.

Deacon, J. W. (1997). *Modern mycology*. Consultado dia 02 de Junho de 2010. Disponível em: <www.books.google.com.br/books?id=WQldeYhfyEC&printsec=frontcover&dq=Modern+Mycology&source=bl&ots=NCbP55t8eq&sig=rj1soH7yf5mgz9aPEdnjeDVzqNw&hl=ptPT&ei=wmATTLnJLoH54AabjtCFDA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CBcQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false>

EPA, (2005). *Environmental Protection Agency. Consumer Factsheet on: 2,4 D*. Consultado no dia 19 de Março de 2010. Disponível em: <www.epa.gov/safewater/contaminants/basicinformation/2-4-d-2-4-dichlorophenoxyacetic-acid.html>.

Gazziero, D.L.O.; Puríssimo, C.; Adegas, F. S.; Voll, E.; Brighenti, A. M. e Prete, C. E. C. (2004). "Tabela periódica dos herbicidas". Coleção: CNPSO.

Consultado dia 16-04.2010. Disponível em: <www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/CNPSO-2009-09/23590>

James, E.; Retzinger, Jr. e Carol Mallory-Smith, C. M. (1997). Classification of Herbicides by Site of Action for Weed Resistance Management Strategies. Consultado dia 13 de abril de 2010. Disponível em: <www.jstor.org/stable/3988742>.

Pesticide Data Base. Consultado dia 10 de Junho de 2010. Disponível em: <www.pesticideinfo.org/List_AquireAll.jsp?Rec_Id=PC35626>.

Rao, V.S. (2000). *Principles of weed science*. Consultado dia 10 de Março de 2010. Disponível em: <www.books.google.com/books?id=iuNS1Yj09XYC&printsec=frontcover&hl=ptPT&source=gb_s_similarbooks_s&cad=1#v=onepage&q&f=false>.

Shiratsuchi, L.S. e Fontes, J. R. A. "Tecnologia de aplicação de herbicidas". Série: Embrapa Cerrados. Documentos, 78. Consultado dia 10 de fevereiro de 2010. Disponível em: <www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/CPAC-2009/25620>

United Nations Population Division (2001). World Population Prospects 1950-2050. Consultado dia 12-12-2009. Disponível em: <www.un.org/esa/population/publications/wpp2000/wpp2000h.pdf>

Walters, J. (2010). *Environmental fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*. Environmental Monitoring and Pest Management. CA 95814-3510. Consultado dia 05-01-2010. Disponível em: <www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/24-d.pdf>

ANEXOS

ANEXO I

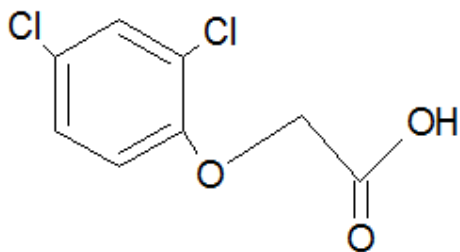
Estruturas químicas dos principais derivados do Ácido 2,4-diclorofenoxiacético: sais de amina e ésteres.

A) Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Fórmula Empírica: $C_8H_6Cl_2O_3$

Massa Molecular: 221.0 g/mol

Registro CAS N°.: 94-75-7

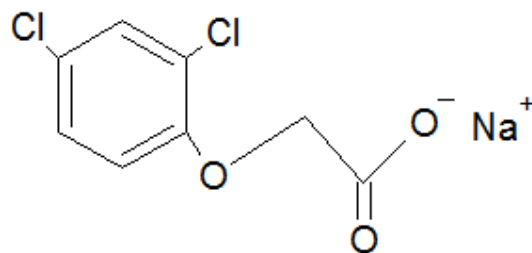


B) Sal 2,4-D de sódio (Na)

Fórmula Empírica: $C_8H_5Cl_2NaO_3$

Massa Molecular: 243.03 g/mol

Registro CAS N°.: 2702-72-9.

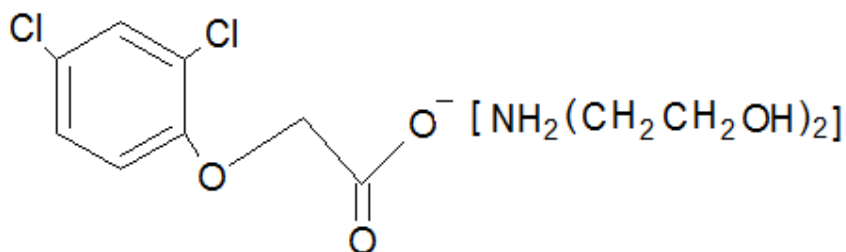


C) Sal 2,4-D di-etanolamina (DEA)

Fórmula Empírica: $C_{12}H_{17}Cl_2NO_5$

Massa Molecular: 326.18 g/mol

Registro CAS N°.: 5742-19-8

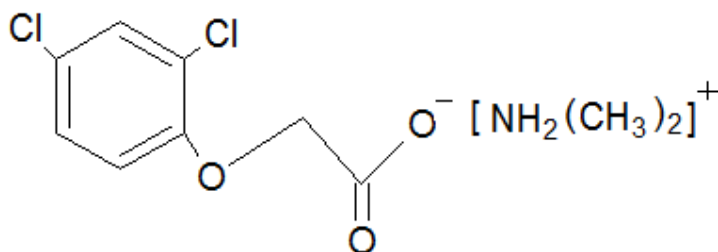


D) Sal 2,4-D di-metilamina (DMA)

Fórmula Empírica: $C_{10}H_{13}Cl_2NO_3$

Massa Molecular: 266.13 g/mol

Registro CAS N°.: 2008-39-1

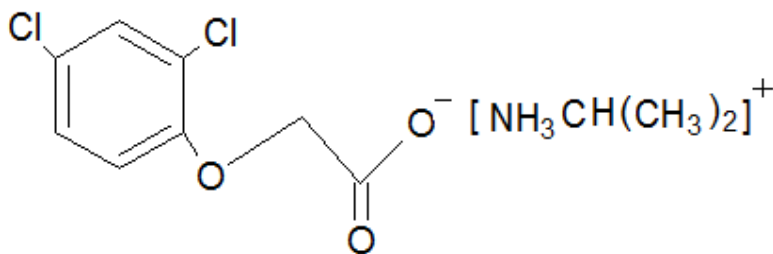


E) Sal 2,4-D isopropilamina(IPA)

Fórmula Empírica: $C_{11}H_{15}Cl_2NO_3$

Massa Molecular: 280.04 g/mol

Registro CAS N°.: 5742-17-6

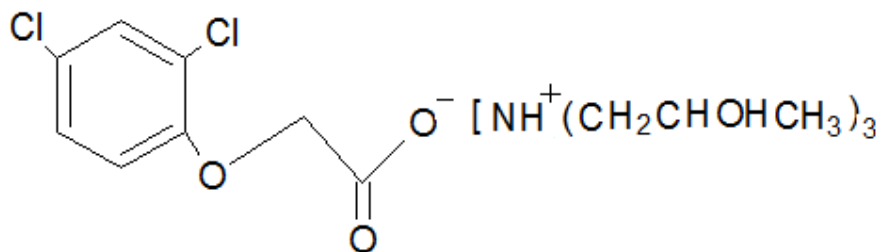


F) Sal 2,4-D tri-isopropanolamina (TIPA)

Fórmula Empírica: $C_{17}H_{27}Cl_2NO_6$

Massa Molecular: 412.31 g/mol

Registro CAS N°.: 32341-80-3

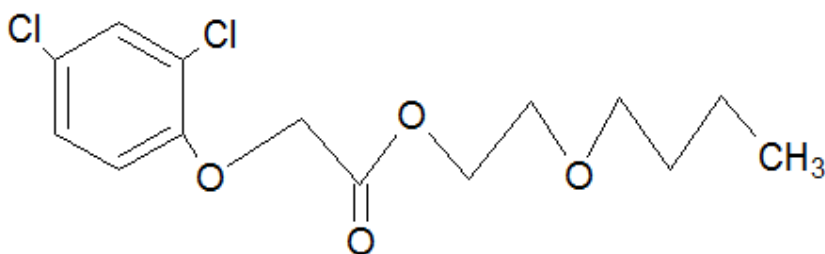


G) Éster 2,4-D 2-butoxietil (BEE)

Fórmula Empírica: $C_{14}H_{18}Cl_2O_4$

Massa Molecular: 321.20 g/mol

Registro CAS N°.: 1929-73-3

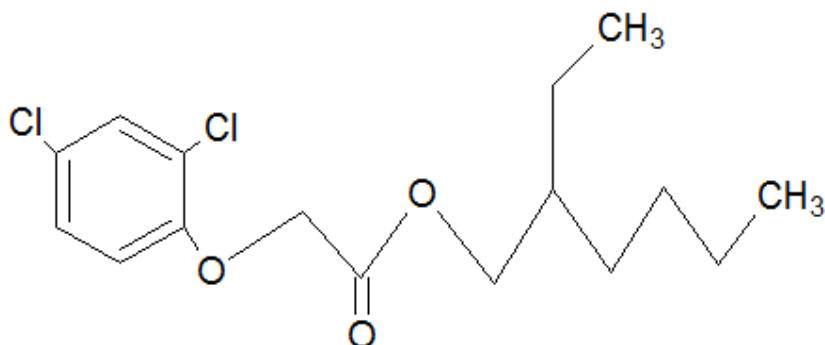


H) Éster 2,4-D 2- etilhexilo (2-EHE)

Fórmula Empírica: $C_{16}H_{22}Cl_2O_3$

Massa Molecular: 333.27 g/mol

Registro CAS N^o.: 1928-43-4

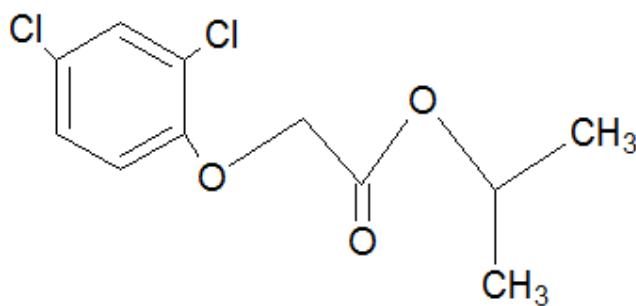


I) Éster 2,4-D isopropil (IPE)

Empirical Formula: $C_{11}H_{12}Cl_2O_3$

Massa Molecular: 263.12 g/mol

Registro CAS N^o.: 94-11-1



Fonte: Adaptado, EPA 2005.

ANEXO II

Parâmetros toxicológicos utilizados para conclusão das avaliações de risco do ácido 2,4-diclorofenoxiacético pelo EPA, 2005.

Cenário de exposição	Dose utilizada na avaliação do risco	FQPA-SF Especial e Nível de preocupação com a Avaliação de Risco	Avaliação dos efeitos toxicológicos
Exposição dietética			
Dieta aguda (Fêmeas 13-49 anos) MRID 00130407, 00130408	NOAEL = 25 mg/kg/dia UF = 1000 RfD agudo = 0.025 mg/kg/dia	FQPA SF = 1X aPAD = 0.025 mg/kg/dia	Estudo de toxicidade no desenvolvimento de ratos. LOAEL = 75 mg/kg/dia com base nas anomalias no esqueleto.
Dieta aguda (População geral, incluindo bebês e crianças).	NOAEL = 67 mg/kg/dia UF = 1000 RfD agudo = 0.067 mg/kg/dia	FQPA SF = 1X aPAD = 0.067 mg/kg/dia	Estudo da neurotoxicidade aguda em ratos. LOAEL = 227 mg/kg/dia, com base nas anormalidades na marcha.
Dieta crônica (População em geral).	NOAEL = 5 mg/kg/dia UF = 1000 RfD crônico = 0.005 mg/kg/dia	FQPA SF = 1X cPAD = 0.005 mg/kg/dia	Estudo de toxicidade crônica em ratos. LOAEL = 75 mg/kg/dia, com base na diminuição ou ganho do peso corporal e consumo de alimentos (fêmeas), alterações na hematologia e parâmetros clínicos (ambos os sexos), glicose, triglicéridos (fêmeas) e colesterol (ambos os sexos).
Exposições não-alimentar: ocupacional e residencial			
Exposição oral a curto prazo (30 dias)	NOAEL = 25 mg/kg/dia	Residencial LOC para MOE = 1000 ocupacional = N/A	Estudo da toxicidade no desenvolvimento de ratos. LOAEL = 75 mg / kg / dia, com base em diminuição do ganho de peso corporal materno.

Cenário de exposição	Dose utilizada na avaliação do risco	FQPA-SF Especial e Nível de preocupação com a Avaliação de Risco	Avaliação dos efeitos toxicológicos
Exposição oral- Intermedia (1-6 meses)	NOAEL = 15 mg/kg/dia	Residencial LOC para MOE = 1000 Ocupacional = N/A	Dose oral subcrônica. LOAEL = 100 mg / kg / dia, com base na variação do peso corporal; alterações hematológicas e parâmetros clínicos; formação de catarata.
Exposição dérmica a curto prazo	Estudo oral NOAEL= 25 mg/kg/dia	Residencial LOC para MOE = 1000 Ocupacional LOC para MOE = 100	Estudo de toxicidade no desenvolvimento de ratos. LOAEL = 75 mg / kg / dia, com base na variação do peso corporal materno e anormalidades esqueléticas.
Exposição dérmica- intermédia (1-6 meses)	Estudo oral NOAEL = 15 mg/kg/dia		Toxicidade oral subcrônica mesmo para prazo intermédio oral .
Exposição dérmica a longo prazo.	Estudo oral NOAEL= 5 mg/kg/dia		Estudo da toxicidade crônica em ratos (o mesmo que para dieta crônica).
Inalação- curto prazo	Estudo oral NOAEL= 25 mg/kg/dia		Toxicidade no desenvolvimento de (o mesmo para toxicidade dérmica de curto prazo).
Inalação- intermédia	Estudo oral NOAEL = 15 mg/kg/dia		Toxicidade Oral sub-crônica em ratos (o mesmo para o prazo intermédio oral).
Exposição a inalação longo prazo	Estudo Oral NOAEL= 5 mg/kg/dia		Estudo de toxicidade crônica em ratos (o mesmo para a dieta

			crónica)
Cancêr	Classificado no grupo D: não classificável quanto à carcinogenicidade humana		
<p>Percentagem do factor de absorção cutânea: 10.</p> <p>Percentagem do factor de absorção e inalação: 100.</p> <p>UF = factor de incerteza, FQPA-SF = factor de segurança especial; NOAEL = nível de efeito adverso não observado, LOAEL= Valor do menor efeitos adversos observados; aPAD= dose aguda ajustada para população; cPAD= dose crónica ajustada para a população; RfD = dose de referência, MOE = margem de exposição, LOC = nível de preocupação, N/A = Não Aplicável</p> <p>Fórmulas: aPAD = (RfD agudo)/ FQPA-SF; cPAD = (RfD crónico)/ FQPA-SF</p>			

Fonte: Adaptado EPA, 2005

ANEXO III

Resultados individuais obtidos das áreas dos picos cromatográficos utilizados na preparação da recta de calibração.

Concentração (mg/L)	Área do pico
5 (1)	141206,0
5 (2)	141136,0
20 (1)	542427,0
20 (2)	556905,0
30 (1)	849470,0
30 (2)	852872,0
40 (1)	1261034
40 (2)	1265093
50 (1)	1521591
50 (2)	1515772
60 (1)	1829183
60 (2)	1827386
75 (1)	2458553
75 (2)	2479606
90 (1)	3000854
90 (2)	2894237
100 (1)	3210328
100 (2)	3185867
120 (1)	3874716
120 (2)	3808278

ANEXO IV

Resultados obtidos do crescimento apical do *Penicillium* em meio sólido com 0%, 2% e 5,9% de (NaCl) com diferentes concentrações do ácido 2.4-diclorofenoxiacético.

Crescimento a pical (mm) em meio sólido com 0% de NaCl (p/v)					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Controlo (1)	15,5	20,5	26,0	32,0	38,0
Controlo (2)	15,5	20,5	25,0	31,0	37,0
Controlo (3)	15,0	20,5	25,0	31,0	36,5
Controlo (4)	15,0	20,0	25,5	33,0	37,0
Controlo (5)	15,0	20,5	25,5	33,0	36,5
Controlo (6)	15,5	20,5	25,0	31,0	37,0
Controlo (7)	15,0	20,5	25,0	31,5	37,5
Controlo (8)	15,5	20,0	26,0	31,0	38,0
Controlo (9)	15,5	20,5	25,0	31,0	36,5
10 (1)	16,0	21,0	25,5	31,0	37,5
10 (2)	15,0	19,0	25,0	31,5	37,0
10 (3)	15,0	19,5	25,0	31,0	37,5
10 (4)	15,0	19,0	25,5	31,0	37,0
10 (5)	15,5	19,5	25,0	30,5	37,5
10 (6)	15,0	21,0	25,5	31,0	37,5
10 (7)	15,5	19,5	25,0	31,5	37,5
10 (8)	16,0	21,0	25,0	31,5	37,0
10 (9)	15,0	19,0	25,0	31,0	37,0
100 (1)	14,5	20,0	25,0	31,0	37,5
100 (2)	14,0	19,5	24,5	31,0	37,5
100 (3)	14,0	19,5	24,0	32,0	37,5
100 (4)	14,0	20,0	25,0	31,5	37,0

Continuação

Crescimento a pical (mm) em meio sólido com 0% de NaCl (p/v)					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
100 (5)	14,0	19,0	25,5	31,0	37,5
100 (6)	14,5	19,5	24,0	31,0	37,5
100 (7)	13,5	20,0	25,0	32,0	37,5
100 (8)	14,5	20,0	25,0	31,5	37,0
100 (9)	14,0	19,5	24,0	31,5	37,0
300 (1)	13,0	18,0	23,0	29,0	32
300 (2)	14,0	19,0	24,5	30,0	33,5
300 (3)	13,0	17,0	23,0	29,0	31,0
300 (4)	13,0	17,5	23,5	30,0	33,0
300 (5)	13,0	18,5	24,0	30,0	32,0
300 (6)	13,5	19,0	23,0	29,5	33,5
300 (7)	14,0	18,0	23,5	30,0	31,0
300 (8)	14,0	17,5	23,5	30,0	33,0
300 (9)	12,0	17,0	24,0	29,0	33,5
500 (1)	13,0	17,0	21,5	27,5	31,0
500 (2)	14,0	18,0	22,0	28,0	30,0
500 (3)	12,5	17,0	22,0	26,0	29,5
500 (4)	13,0	18,0	22,5	26,5	30,0
500 (5)	13,5	17,5	22,0	27,0,	30,5
500 (6)	13,0	17,5	21,5	27,5	29,0
500 (7)	13,0	18,0	21,5	27,0	30,0

Continuação

Crescimento a pical (mm) em meio sólido com 0% de NaCl (p/v)					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
500 (8)	130	17,0	21,5	28,0	31,0
500 (9)	13,5	18,0	21,5	27,0	29,0
1000 (1)	6,00	9,00	14,0	24,0	25,0
1000 (2)	8,00	11,0	15,0	24,5	25,5
1000 (3)	8,00	10,5	15,0	24,0	25,0
1000 (4)	6,00	10,0	15,0	23,5	25,0
1000 (5)	6,00	10,5	14,5	23,0	26,0
1000 (6)	8,00	10,0	14,0	23,5	25,0
1000 (7)	8,00	9,50	14,5	24,0	25,5
1000 (8)	7,50	10,0	14,5	24,0	24,5
1000 (9)	8,00	11,0	15,0	24,0	25,0

Crescimento a pical (mm) em meio sólido com 2% de NaCl (p/v)					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Controlo (1)	19,0	26,5	35,0	42,0	50,0
Controlo (2)	18,5	27,0	35,5	42,5	50,0
Controlo (3)	18,5	27,5	35,0	43,0	50,5
Controlo (4)	18,5	27,0	35,0	43,0	50,0
Controlo (5)	19,0	26,5	36,5	42,0	50,0
Controlo (6)	19,0	27,0	35,5	43,0	50,5
Controlo (7)	18,5	27,0	35,0	42,5	49,0
Controlo (8)	18,5	27,0	35,5	42,0	51,0
Controlo (9)	19,0	27,0	35,0	42,0	51,0
10 (1)	18,0	25,0	33,0	42,0	49,5
10 (2)	17,5	26,0	34,0	40,5	48,0
10 (3)	18,0	26,5	33,5	40,0	49,0
10 (4)	18,5	25,5	34,0	41,5	48,5
10 (5)	17,0	25,0	34,0	40,5	48,5
10 (6)	17,0	26,5	34,5	41,0	49,0
10 (7)	18,0	25,5	34,0	40,0	49,0
10 (8)	18,0	24,5	34,5	42,0	48,5
10 (9)	18,0	25,0	34,0,	41,0	49,0
100 (1)	18,0	25,0	33,5	40,5	48,0
100 (2)	18,0	26,0	36,0	41,0	48,5
100 (3)	18,5	25,0	33,0	42,0	47,5
100 (4)	18,0	27,0	35,0	43,0	47,0

Continuação

Crescimento a pical (mm) em meio sólido com 2% de NaCl (p/v)					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
100 (5)	18,5	26,5	34,5	41,0	48,0
100 (6)	18,0	26,0	35,5	42,5	47,5
100 (7)	19,0	25,5	35,5	41,0	48,0
100 (8)	17,5	26,5	36,0	40,0	48,5
100 (9)	18,0	25,5	34,5	40,0	48,0
300 (1)	16,5	23,5	32,0	38,5	47,0
300 (2)	16,5	22,5	31,0	36,5	46,0
300 (3)	16,0	24,0	31,5	37,5	46,5
300 (4)	16,5	23,0	31,0	38,5	46,0
300 (5)	15,5	23,5	31,5	38,0	46,0
300 (6)	15,5	24,0	32,5	38,0	45,5
300 (7)	15,5	23,0	31,0	36,5	46,0
300 (8)	16,5	22,5	31,0	38,0	46,5
300 (9)	17,0	24,0	32,0	37,5	46,5
500 (1)	14,5	21,5	28,5	34,0	42,5
500 (2)	14,5	20,0	28,0	34,5	42,0
500 (3)	14,0	20,5	26,5	33,0	41,5
500 (4)	15,0	21,5	27,0	34,0	41,0
500 (5)	15,0	21,0	27,5	34,5	41,0
500 (6)	14,0	21,5	27,5	33,0	41,5
500 (7)	15,5	21,0	27,0	36,0	40,5

Continuação

Crescimento a pical (mm) em meio sólido com 2% de NaCl (p/v)					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
500 (8)	14,5	21,0	28,0	35,0	41,0
500 (9)	15,0	21,5	26,0	35,5	41,5
1000 (1)	9,00	13,0	17,5	22,5	29,5
1000 (2)	9,00	14,5	17,5	21,0	30,0
1000 (3)	8,00	13,0	18,0	23,0	29,0
1000 (4)	9,00	14,0	18,5	23,5	29,0
1000 (5)	8,50	14,0	18,0	22,5	29,5
1000 (6)	9,00	15,5	18,0	23,0	29,0
1000 (7)	9,50	15,0	18,0	24,0	30,0
1000 (8)	9,00	14,0	19,0	24,5	29,0
1000 (9)	9,00	14,5	18,5	24,5	31,0

Crescimento a pical (mm) em meio sólido com 5,9% de NaCl (p/v)					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Controlo (1)	13,5	20,0	26,0	33,0	39,0
Controlo (2)	14,0	19,5	25,0	34,0	40,0
Controlo (3)	14,5	20,0	25,5	33,5	38,0
Controlo (4)	14,5	21,0	24,5	33,0	38,5
Controlo (5)	14,5	20,5	24,0	33,5	39,0
Controlo (6)	15,0	20,0	25,0	33,0	39,5
Controlo (7)	14,0	19,5	25,5	33,0	38,0
Controlo (8)	13,0	19,0	25,0	33,0	39,5
Controlo (9)	14,0	19,5	25,5	32,5	38,5
10 (1)	14,0	20,0	25,0	32,5	39,0
10 (2)	14,5	21,0	25,0	34,0	39,0
10 (3)	15,0	19,5	24,5	33,0	38,5
10 (4)	13,0	19,0	24,5	33,5	40,0
10 (5)	14,0	18,5	24,0	33,0	39,5
10 (6)	13,0	19,0	25,5	33,0	39,5
10 (7)	13,0	21,0	25,5	32,0	38,0
10 (8)	15,0	19,0	24,5	32,0	38,5
10 (9)	13,0	19,5	25,0	33,0	38,0
100 (1)	14,0	21,0	24,0	33,0	39,0
100 (2)	13,5	19,5	24,0	33,0	39,0
100 (3)	14,0	20,0	24,5	33,0	38,5
100 (4)	14,0	19,0	24,0	32,0	39,0

Continuação

Crescimento a pical (mm) em meio sólido com 5,9% de NaCl (p/v)					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
100 (5)	13,5	18,5	24,5	33,5	39,0
100 (6)	14,5	21,0	25,0	31,0	39,0
100 (7)	14,0	19,0	25,5	33,5	38,5
100 (8)	14,0	19,5	25,0	33,5	39,0
100 (9)	13,5	21,0	23,0	34,5	38,5
300 (1)	13,0	18,5	24,0	31,5	38,0
300 (2)	13,5	18,5	23,0	31,0	37,0
300 (3)	12,5	17,5	23,0	31,0	37,0
300 (4)	13,0	17,5	23,0	32,0	36,5
300 (5)	12,5	19,5	23,5	31,5	38,0
300 (6)	13,5	18,5	23,5	31,0	37,5
300 (7)	12,0	19,0	22,0	30,0	37,0
300 (8)	12,5	18,5	23,5	30,5	38,0
300 (9)	13,0	18,0	24,5	31,0	37,5
500 (1)	11,0	15,0	19,0	24,5	31,0
500 (2)	9,50	14,5	18,5	25,5	30,0
500 (3)	10,0	15,0	19,0	25,0	30,5
500 (4)	9,00	15,5	18,5	25,0	31,0
500 (5)	11,0	15,5	19,0	25,5	31,5
500 (6)	11,5	15,5	18,5	24,5	31,0
500 (7)	10,5	14,5	20,0	24,5	30,0

Continuação

Crescimento a pical (mm) em meio sólido com 5,9% de NaCl (p/v)					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
500 (8)	10,5	15,0	19,0	24,5	29,5
500 (9)	10,0	14,5	19,5	25,0	30,5
1000 (1)	6,00	9,00	13,0	18,0	22,0
1000 (2)	5,50	8,50	13,0	18,5	21,5
1000 (3)	6,00	9,00	12,5	17,5	21,0
1000 (4)	6,50	8,50	12,0	17,0	23,0
1000 (5)	6,00	8,50	13,5	17,5	23,5
1000 (6)	7,00	10,0	12,5	18,5	23,0
1000 (7)	6,50	9,00	12,0	18,0	22,5
1000 (8)	5,50	9,50	14,0	18,0	22,0
1000 (9)	5,00	9,00	13,0	17,5	22,5

ANEXO V

Equações da recta obtidas para cálculo da taxa de crescimento apical em meio sólido com 0%, 2% e 5,9% de (NaCl) e diferentes concentrações do ácido 2.4-diclorofenoxiacético.

0% de NaCl (p/v)		
Amostra (mg/L)	Equação linear da Recta	R ²
Controlo	y= 0,2632x - 5,583	0,9953
10	Y= 0,3201x - 4,850	0,9981
100	y= 0,2632x - 5,616	0,9913
300	y= 0,2576x - 6,316	0,9941
500	y= 0,2090x - 5,150	0,9946
1000	y= 0,1729x - 7,150	0,9915

2% de NaCl (p/v)		
Amostra (mg/L)	Equação linear da Recta	R ²
Controlo	y= 0,3410x - 5,783	0,9980
10	Y= 0,3201x - 4,850	0,9981
100	y= 0,3174x - 4,750	0,9981
300	y= 0,3118x - 6,476	0,9972
500	y= 0,2903x - 6,833	0,9991
1000	y= 0,1938x - 5,483	0,9955

5,9% de NaCl (p/v)		
Amostra (mg/L)	Equação linear da Recta	R ²
Controlo	y= 0,2285x - 1,416	0,9982
10	Y= 0,2299x - 1,850	0,9959
100	y= 0,2431x -3,700	0,9973
300	y= 0,2083x -1,600	0,9898
500	y= 0,1806x - 0,266	0,9937
1000	y= 0,1458x -3,333	0,9955

ANEXO VI

Resultados obtidos do crescimento apical do *Penicillium* em meio sólido suplementados com diferentes açúcares: Lactose, Glicose e Sacarose.

Crescimento (mm) sem fonte de carbono suplementar					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Controle (1)	12,0	15,5	21,0	27,0	32,5
Controle (2)	11,0	16,5	22,0	27,0	33,5
Controle (3)	12,0	15,5	21,0	26,0	33,0
Controle (4)	10,5	15,0	21,5	26,5	34,0
Controle (5)	10,5	15,5	20,5	26,5	33,0
Controle (6)	11,5	16,5	20,0	27,0	33,5
10 (1)	10,0	15,0	20,0	25,0	31,5
10 (2)	9,50	16,0	20,5	24,0	32,0
10 (3)	10,0	15,0	21,0	25,0	31,0
10 (4)	10,5	15,5	21,0	24,5	31,5
10 (5)	10,0	15,5	19,5	25,5	32,0
10 (6)	10,0	15,0	20,0	26,0	31,0
25 (1)	11,0	17,5	22,0	28,0	34,0
25 (2)	10,0	15,5	21,0	27,0	34,5
25 (3)	11,0	15,0	20,0	26,5	32,0
25 (4)	11,5	16,0	21,0	26,0	34,0
25 (5)	10,0	17,0	21,5	25,5	33,5
25 (6)	11,5	15,5	20,5	27,0	33,0
50 (1)	10,0	16,0	20,0	26,0	33,0
50 (2)	10,0	14,5	19,0	25,0	32,0
50 (3)	9,50	16,0	21,0	26,0	33,0
50 (4)	9,00	15,0	20,0	25,0	32,0
50 (5)	9,00	15,5	20,5	26,0	32,5
50 (6)	9,50	16,0	19,5	26,0	33,5
100 (1)	9,00	14,0	19,0	25,5	31,0
100 (2)	9,50	14,5	20,0	26,0	32,0
100 (3)	9,00	15,0	20,0	26,0	33,0
100 (4)	9,50	14,0	19,5	25,0	32,0
100 (5)	9,50	15,0	19,5	24,5	32,0

Continuação

Crescimento (mm) sem fonte de carbono suplementar					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
100 (6)	8,50	14,5	20,0	27,0	32,0
300 (1)	10,0	13,5	17,0	23,0	29,0
300 (2)	8,50	13,5	18,0	23,0	29,0
300 (3)	9,00	14,0	18,5	24,0	30,5
300 (4)	8,00	13,5	19,0	23,0	29,0
300 (5)	9,50	14,0	18,0	22,5	29,5
300 (6)	9,50	13,5	17,5	24,5	30,5
500 (1)	8,50	12,5	16,0	21,5	28,0
500 (2)	7,50	11,5	16,0	21,5	29,5
500 (3)	8,50	12,5	17,0	22,5	29,0
500 (4)	7,50	12,0	16,5	21,5	28,0
500 (5)	8,50	11,0	17,0	20,0	27,0
500 (6)	8,00	13,5	15,5	23,0	27,0
1000 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (4)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (5)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (6)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C

*N.C: Não apresentou crescimento.

Crescimento (mm) em meio sólido suplementado com 2% de Glicose					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Controle (1)	14,5	21,0	38,0	41,5	48,0
Controle (2)	14,5	20,5	38,5	42,0	49,0
Controle (3)	15,0	21,0	38,5	43,0	48,0
Controle (4)	15,0	21,0	38,0	43,0	48,5
Controle (5)	16,0	20,0	39,0	42,5	47,5
Controle (6)	15,0	21,5	38,0	42,0	47,5
10 (1)	16,5	21	40,0	43,0	49,0
10 (2)	16,0	22,0	38,0	43,5	48,0
10 (3)	16,5	21,0	39,0	43,0	48,0
10 (4)	16,0	23,0	39,5	42,0	48,0
10 (5)	16,5	20,0	39,0	43,5	50,0
10 (6)	15,5	19,5	38,5	44,0	49,0
25 (1)	15,5	20,5	38,0	43,0	48,0
25 (2)	13,0	19,5	37,5	42,0	47,0
25 (3)	15,0	20,0	37,0	41,0	46,5
25 (4)	16,0	19,5	38,0	40,0	45,5
25 (5)	15,0	21,0	37,0	42,0	47,5
25 (6)	15,5	21,5	38,0	41,5	45,5
50 (1)	13,0	17,0	34,5	38,5	42,5
50 (2)	14,0	18,5	36,0	40,0	45,0
50 (3)	14,5	18,5	36,5	41,5	45,0
50 (4)	13,5	19,0	35,0	39,0	44,0
50 (5)	13,5	18,5	36,5	41,0	45,5
50 (6)	14,5	17,0	35,5	37,5	45,5
100 (1)	13,0	18,5	37,5	39,0	44,5
100 (2)	14,0	20,0	37,5	39,0	44,0
100 (3)	14,5	19,0	36,0	39,0	45,0
100 (4)	14,0	19,0	35,0	39,5	43,0
100 (5)	15,0	18,0	36,0	40,5	44,5

Continuação

Crescimento (mm) em meio sólido suplementado com 2% de Glicose					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
100 (6)	13,5	19,5	36,0	37,5	45,0
300 (1)	13,0	19,0	26,0	38,0	42,0
300 (2)	13,0	18,0	24,0	37,0	42,0
300 (3)	13,0	17,0	24,0	38,0	42,0
300 (4)	13,5	18,5	23,0	38,0	42,0
300 (5)	12,0	18,0	24,0	37,5	43,0
300 (6)	13,5	17,5	23,0	37,5	43,0
500 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (4)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (5)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (6)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (4)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (5)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (6)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C

*N.C: Não apresentou crescimento.

Crescimento (mm) em meio sólido suplementado com 2% de Lactose					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Controle (1)	12,5	19,0	23,0	35,5	40,0
Controle (2)	13,0	18,5	24,0	35,0	41,0
Controle (3)	12,0	20,0	25,0	31,0	42,0
Controle (4)	12,0	17,5	26,5	34,0	41,0
Controle (5)	12,5	18,0	24,5	33,0	40,5
Controle (6)	13,0	19,0	25,0	36,0	42,0
10 (1)	11,0	18,0	25,5	31,0	41,5
10 (2)	11,5	17,0	26,0	32,0	42,5
10 (3)	12,0	16,5	26,0	32,0	42,0
10 (4)	12,0	16,0	25,0	31,5	42,0
10 (5)	11,0	16,5	25,5	31,5	43,0
10 (6)	11,5	17,0	27,0	32,0	41,0
25 (1)	13,5	18,0	24,5	38,5	43,0
25 (2)	13,0	17,5	25,0	38,0	42,5
25 (3)	13,0	18,0	24,0	37,5	42,0
25 (4)	13,5	17,0	23,5	36,5	43,0
25 (5)	12,5	18,5	24,0	36,5	42,0
25 (6)	12,5	19,0	23,5	35,5	42,5
50 (1)	13,0	19,0	25,0	37,0	41,0
50 (2)	12,5	18,0	24,0	37,0	42,5
50 (3)	13,0	18,0	26,0	36,5	42,0
50 (4)	14,0	18,0	24,0	37,0	41,0
50 (5)	12,5	17,5	23,0	35,5	42,5
50 (6)	13,0	18,0	25,0	36,0	40,0
100 (1)	13,5	18,0	24,0	36,0	42,5
100 (2)	13,0	18,0	24,5	35,5	43,0
100 (3)	13,0	17,5	23,0	37,0	42,5
100 (4)	13,5	17,0	24,5	36,0	43,5
100 (5)	12,0	16,5	24,0	35,5	41,5

Continuação

Crescimento (mm) em meio sólido suplementado com 2% de Lactose					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
100 (6)	12,5	18,0	24,5	36,0	43,0
300 (1)	9,50	14,5	21,0	36,0	40,0
300 (2)	9,00	14,5	22,0	35,5	40,5
300 (3)	10,5	15,0	22,0	36,0	40,0
300 (4)	9,50	15,5	22,5	35,0	41,0
300 (5)	9,50	13,5	22,5	35,5	40,0
300 (6)	9,50	15,0	22,0	37,0	39,0
500 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (4)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (5)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (6)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (4)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (5)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (6)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C

*N.C: Não apresentou crescimento.

Crescimento (mm) em meio sólido suplementado com 2% de Sacarose					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Controle (1)	19,0	27,0	36,0	43,0	50,0
Controle (2)	18,0	27,0	36,5	42,0	51,0
Controle (3)	18,5	27,5	35,0	43,0	51,5
Controle (4)	18,5	26,5	36,0	43,0	52,0
Controle (5)	19,0	28,0	35,0	42,0	51,0
Controle (6)	18,5	26,5	35,0	41,0	51,5
10 (1)	18,0	27,5	34,5	42,0	49,5
10 (2)	19,0	25,0	33,0	40,5	48,0
10 (3)	18,0	26,0	34,5	40,0	49,0
10 (4)	17,0	26,0	34,0	41,0	48,0
10 (5)	16,5	26,5	33,5	41,5	48,5
10 (6)	17,0	27,0	34,5	39,0	49,0
25 (1)	18,0	26,5	34,0	41,0	49,0
25 (2)	17,5	26,0	33,5	40,0	48,0
25 (3)	18,5	26,5	34,5	40,5	48,5
25 (4)	18,0	26,5	34,0	41,0	49,0
25 (5)	19,0	25,5	34,5	40,0	49,5
25 (6)	18,5	27,0	33,0	40,5	48,0
50 (1)	19,0	27,0	35,0	42,5	48,0
50 (2)	19,0	27,0	34,5	41,0	47,0
50 (3)	19,5	28,0	35,0	41,0	47,5
50 (4)	18,0	26,0	34,0	40,5	49,0
50 (5)	18,6	27,0	34,5	40,5	47,0
50 (6)	18,0	26,5	34,0	41,5	48,0
100 (1)	19,0	26,0	33,5	42,0	49,0
100 (2)	18,0	27,0	36,0	43,0	49,5
100 (3)	18,5	24,0	35,0	40,0	50,0
100 (4)	17,0	25,0	34,0	43,0	49,5
100 (5)	17,5	26,0	36,0	42,0	49,5

Continuação

Crescimento (mm) em meio sólido suplementado com 2% de Sacarose					
Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
100 (6)	18,5	27,0	35,5	41,0	50,0
300 (1)	16,5	23,5	32,0	38,5	47,0
300 (2)	16,0	22,5	31,0	36,5	46,0
300 (3)	16,0	24,0	31,5	37,5	46,5
300 (4)	16,0	23,0	32,0	38,0	46,0
300 (5)	16,5	23,5	31,5	37,0	45,5
300 (6)	15,0	23,5	31,0	38,5	47,0
500 (1)	14,5	21,5	28,5	35,0	42,5
500 (2)	14,5	21,0	28,0	35,0	40,5
500 (3)	14,0	20,5	26,5	33,0	41,5
500 (4)	14,0	21,0	27,0	35,0	42,0
500 (5)	15,0	21,0	26,5	33,5	41,0
500 (6)	15,5	21,0	28,0	34,0	42,0
1000 (1)	9,00	14,0	17,5	22,5	30,0
1000 (2)	9,00	14,5	19,0	23,5	29,0
1000 (3)	8,00	14,5	18,0	23,0	30,0
1000 (4)	9,00	14,0	18,0	23,0	30,0
1000 (5)	9,50	15,0	18,5	23,5	29,0
1000 (6)	9,00	15,0	18,0	24,0	29,0

*N.C: Não apresentou crescimento.

ANEXO VII

Equações da recta obtidas para cálculo do crescimento apical do *Penicillium* em meio sólido suplementados com diferentes açúcares: Lactose, Glicose e Lactose.

Sem fonte de carbono suplementar		
Amostra (mg/L)	Equação linear da Recta	R ²
Controlo	y= 0,2313x - 6,125	0,9945
10	Y= 0,2195x - 5,903	0,9970
25	y= 0,2333x - 6,402	0,9958
50	y= 0,2348x - 7,528	0,9952
100	y= 0,2368x - 8,224	0,9980
300	y= 0,2111x - 6,637	0,9949
500	y= 0,2063x - 7,520	0,9907

2% de Sacarose		
Amostra (mg/L)	Equação linear da Recta	R ²
Controlo	y= 0,3254x - 4,377	0,9989
10	Y= 0,3229x - 5,349	0,9994
25	y= 0,3132x - 4,119	0,9985
50	y= 0,3033x - 2,620	0,9975
100	y= 0,3278x - 5,294	0,9987
300	y= 0,3108x - 6,340	0,9983
500	y= 0,2788x - 5,730	0,9992
1000	y= 0,2072x - 5,966	0,9916

2% de Lactose		
Amostra (mg/L)	Equação linear da Recta	R ²
Controlo	y= 0,3014x - 10,00	0,9934
10	Y= 0,3160x - 12,35	0,9889
25	y= 0,3250x - 12,10	0,9816
50	y= 0,3250x - 12,10	0,9816
100	y= 0,3258x - 12,58	0,9974
300	y= 0,3425x - 16,72	0,9962

2% de Glicose		
Amostra (mg/L)	Equação linear da Recta	R ²
Controlo	y= 0,3646x - 10,85	0,9843
10	Y= 0,3632x - 9,983	0,9876
25	y= 0,3521x - 10,05	0,9916
50	y= 0,3452x - 11,12	0,9895
100	y= 0,3312x - 9,079	0,9868
300	y= 0,3264x - 12,16	0,9865

ANEXO VIII

Resultados obtidos do crescimento apical do *Penicillium* em meio sólido com diferentes concentrações do 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) e as equações da rectas utilizadas para o cálculo da taxa de crescimento apical.

Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
Controlo (1)	10,0	16,0	22,0	28,0	33,5
Controlo (2)	11,0	17,0	24,0	29,0	36,0
Controlo (3)	10,5	15,0	22,0	28,0	33,5
1 (1)	9,00	15,0	21,0	28,5	33,0
1 (2)	8,00	14,5	20,0	27,5	32,0
1 (3)	8,00	15,0	20,5	28,0	33,0
10 (1)	8,50	14,0	19,5	26,0	31,5
10 (2)	8,50	15,5	21,0	27,0	32,5
10 (3)	8,40	14,0	20,0	28,0	33,0
25 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
25 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
25 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
50 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
50 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
50 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
100 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
100 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
100 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
300 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
300 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
300 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
500 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C

Amostras (mg/L)	72 Horas	96 Horas	120 Horas	144 Horas	168 Horas
1000 (1)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (2)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
1000 (3)	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C

*N.C: Não apresentou crescimento.

Amostra	Equação da Recta	R ²
Controlo	y= 0,250x - 7,631	0,9993
1 mg/L	y= 0,257x - 10,05	0,9963
10 mg/L	y= 0,251x - 9,630	0,9989

ANEXO IX

Resultados obtidos da Carência Bioquímica de Oxigénio em cinco dias com 1 e com 3 lavagens do micélio

1 Lavagem					
CBO ₅ (mg/L)	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Controlo sem 2,4 D (1)	12	18	26	32	*
Controlo sem 2,4 D (2)	14	18	26	30	*
Controlo com 2,4 D (1)	68	92	*	*	*
Controlo com 2,4 D (2)	66	88	*	*	*
0,29 µM (1)	48	68	80	90	*
0,29 µM (2)	56	78	90	93	*
0,59 µM (1)	68	76	82	88	*
0,59 µM (2)	48	68	80	88	*
1,18 µM (1)	52	72	84	89	*
1,18 µM (2)	52	72	86	86	*
3 Lavagens					
CBO ₅ (mg/L)	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Controlo sem 2,4 D (1)	20	28	34	38	42
Controlo sem 2,4 D (2)	20	26	34	38	42
Controlo com 2,4 D (1)	26	38	46	52	56
Controlo com 2,4 D (2)	26	36	44	50	54
0,29 µM (1)	32	44	54	56	62
0,29 µM (2)	34	42	50	54	60
0,59 µM (1)	26	40	48	52	58
0,59 µM (2)	30	38	44	50	54
1,18 µM (1)	40	52	64	70	76
1,18 µM (2)	40	54	62	68	72

*Valor superior à capacidade de detecção do aparelho respirométrico.

ANEXO X

Resultados dos ensaios respirométricos com objectivo de estudar a influência da adição do α -cetoglutarato, ácido ascórbico e manganês como co-substratos na biodegradação do 2,4-D pelo *Penicillium chrysogenum* CLONA 2.

Controlos: Microrganismo + substrato					
	24	48	72	96	120
CBO₅ (mg/L)	Horas	horas	Horas	Horas	Horas
Microrganismo (1)	20	28	34	38	42
Microrganismo (2)	34	40	44	46	48
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2)	30	44	50	56	60
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1)	26	38	48	52	56
Manganês (1)	38	48	56	62	66
Manganês (2)	26	38	46	52	56
Ácido α -cetoglutárico (2)	82	*	*	*	*
Ácido α -cetoglutárico (1)	36	70	90	*	*
Ácido ascórbico (1)	42	50	54	58	60
Ácido ascórbico (2)	8,0	8,0	10	12	14
Amostras: Substratos + 40 mg/L de 2,4-D					
	24	48	72	96	120
CBO₅ (mg/L)	Horas	horas	Horas	Horas	Horas
2,4-D + Manganês (1)	42	56	64	72	76
2,4-D + Manganês (2)	40	52	64	70	76
2,4-D + Manganês (3)	40	54	62	68	72
2,4-D+ Ácido ascórbico (1)	56	68	76	80	84
2,4-D+ Ácido ascórbico (2)	60	74	82	86	90
2,4-D+ Ácido ascórbico (3)	42	66	72	76	76
2,4-D+ Ácido α -cetoglutárico (1)	66	*	*	*	*
2,4-D+ Ácido α -cetoglutárico (2)	72	*	*	*	*
2,4-D+ Ácido α -cetoglutárico (3)	92	*	*	*	*

*Valor superior à capacidade de detecção do aparelho respirométrico.

Nota: As concentrações adicionadas dos co-substratos foram: 1 mM de α -cetoglutarato, 200 μ M de ácido ascórbico e 1,18 μ M de Manganês.

ANEXO XI

Tabela com a percentagem de degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e do 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) por algumas espécies de fungos descritas na literatura.

Microrganismo	% de degradação	
	2,4-D	2,4-DCP
Agomycetes		
<i>Rhizoctonia solani</i>	15	31
<i>Rhizoctonia</i> sp.	6,0	27
<i>Rhizoctonia</i> sp.	18	32
<i>Sclerotium</i> sp.	35	24
Aspergillus		
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,0	19
<i>Aspergillus penicilloides</i>	52	14
<i>Aspergillus terreus</i>	2,0	11
<i>Aspergillus ustus</i>	3,0	40
<i>Aspergillus versicolor</i>	6,0	11
Dematiaceae		
<i>Acremonium murorum</i>	34	34
<i>Alternaria alternata</i>	6,0	26
<i>Alternaria raphani</i>	4,0	17
<i>Aureobasidium pullulans</i>	3,0	9,0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	13	49
<i>Cladosporium herbarum</i>	23	27
<i>Drechslera spicifera</i>	5,0	47
<i>Embellisia annulatum</i>	9,0	27
<i>Oidiodendron tenuissimum</i>	9,0	9,0
<i>Oidiodendron echinulatum</i>	12	12
<i>Scytalidium lignicola</i>	4,0	24

Continuação.

Microrganismo	% de degradação	
	2,4-D	2,4-DCP
<i>Penicillium</i>		
<i>Penicillium atramentosum</i>	4,0	44
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	8,0	9,0
<i>Penicillium crhysogenum</i>	1,0	6,0
<i>Penicillium cyaneum</i>	0,0	24
<i>Penicillium italicum</i>	0,0	16
<i>Penicillium purpurescens</i>	1,0	25
<i>Melanconiales</i>		
<i>Cicinobolus cesatii</i>	10	31
<i>Colletotrichum dematium</i>	4,0	26
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	7,0	30
<i>Colletotrichum musae</i>	8,0	12
<i>Pestalotia palmarum</i>	29	19
<i>Pestalotia truncata</i>	10	6,0
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	7,0	22
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	15	30
<i>Truncatella</i> sp.	1,0	25
<i>Mucedinaceae</i>		
<i>Acremonium chrysogenum</i>	18	41
<i>Acremonium roseum</i>	8,0	20
<i>Beauveria alba</i>	35	38
<i>Calcarisporium arbuscula</i>	3,0	35
<i>Chrysosporium pannorum</i>	10	61

Continuação.

Microrganismo	% de degradação	
	2,4-D	2,4-DCP
<i>Cladobotryum verticillatum</i>	29	18
<i>Paecilomyces variotii</i>	3,0	8,0
<i>Sporothrix cyanescens</i>	24	13
<i>Trichoderma harzianum</i>	20	16
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	25	18
<i>Verticillium lecanii</i>	22	22
<i>Verticillium leptobactrum</i>	26	13
Sphaeropsidales		
<i>Ascochyta imperfecta</i>	0,0	35
<i>Coniothyrium</i> sp.	0,0	37
<i>Coniothyrium sporulosum</i>	8,0	27
<i>Macrodiplodia zeae</i>	11	39
<i>Phoma glomerata</i>	15	58
<i>Phoma herbarum</i>	3,0	4,0
<i>Trematophoma</i> sp.	7,0	35
Stibellales		
<i>Dicyma ampullifera</i>	2,0	4,0
<i>Doratomyces stemonitis</i>	9,0	6,0
<i>Doratomyces microsporus</i>	12	17
<i>Trichurus spiralis</i>	16	26
Tuberculariales		
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	19	18
<i>Cylindrocarpon ianthothele</i>	15	27
<i>Cylindrocarpon macrosporum</i>	7,0	24
<i>Epicoccum nigrum</i>		

Continuação.

Microrganismo	% de degradação	
	2,4-D	2,4-DCP
<i>Fusarium coeruleum</i>	19	16
<i>Fusarium fusarioides</i>	29	18
<i>Fusarium solani</i>	17	21
<i>Fusarium sulphureum</i>	2,0,	35
<i>Myrothecium gramineum</i>	1,0	11
Zygomycetes		
<i>Absidia glauca</i>	13	34
<i>Absidia spinosa</i>	9,0	31
<i>Cunninghamella bainieri</i>	8,0	24
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	20	36
<i>Cunninghamella echinulata</i>	11	36
<i>Cunninghamella elegans</i>	14	45
<i>Helicostylum piriforme</i>	8,0	30
<i>Mortierella bainieri</i>	28	22
<i>Mortierella hyalina</i>	11	12
<i>Mortierella isabellina</i>	46	41
<i>Mortierella ramanniana</i>	25	14
<i>Mucor mucedo</i>	11	5,0
<i>Mucor genevensis</i>	16	65
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	5,0	34
<i>Rhizopus arrhizus</i>	28	24

Fonte: Adaptado de Vroumsia *et al.*, 2005.

ANEXO XII

Valores obtidos do pH e da Biomassa no ensaio com diferentes valores do pH inicial do meio: 5,70; 6,50 com tampão e 7,00.

pH inicial 5,70			pH inicial 5,70		
Tempo (Horas)	pH	Biomassa*	Tempo (Horas)	pH	Biomassa*
1 (1)	4,88	0,1541	9 (1)	4,13	0,2171
1 (2)	4,85	0,1686	9 (2)	4,14	0,2098
2 (1)	4,69	0,1687	10 (1)	4,53	0,2165
2 (2)	4,8	0,1501	10 (2)	4,51	0,2112
3 (1)	4,72	0,1647	15 (1)	4,91	0,2191
3 (2)	4,77	0,1598	15 (2)	4,89	0,2101
4 (1)	4,48	0,1691	22 (1)	5,59	0,2255
4 (2)	4,49	0,1612	22 (2)	5,74	0,2104
5 (1)	4,25	0,1803	27 (1)	5,87	0,1939
5 (2)	4,23	0,1930	27 (2)	5,84	0,2321
6 (1)	4,02	0,1943	31 (1)	5,92	0,1776
6 (2)	3,67	0,1898	31 (2)	6,05	0,1586
7 (1)	3,93	0,2075	48 (1)	6,23	0,1567
7 (2)	3,41	0,2229	48 (2)	5,84	0,1781
8 (1)	3,79	0,2089			
8 (2)	3,97	0,2201			

*Valores da Biomassa em (g).

pH inicial de 6,50			pH inicial de 6,50		
Tempo (Horas)	pH	Biomassa*	Tempo (Horas)	pH	Biomassa*
1 (1)	6,45	0,1492	8 (1)	6,42	0,1916
1 (2)	6,43	0,1681	8 (2)	6,45	0,1865
2 (1)	6,45	0,1841	9 (1)	6,48	0,1682
2 (2)	6,41	0,1350	9 (2)	6,41	0,2392
3 (1)	6,44	0,1698	10 (1)	6,43	0,2314
3 (2)	6,41	0,1904	10 (2)	6,45	0,1906
5 (1)	6,36	0,1896	15 (1)	6,47	0,2142
5 (2)	6,47	0,1804	15 (2)	6,46	0,1988
6 (1)	6,40	0,2397	36 (1)	6,48	0,1450
6 (2)	6,42	0,2439	36 (2)	6,46	0,1478
7 (1)	6,42	0,1719	48 (1)	6,46	0,1222
7 (2)	6,43	0,2313	48 (2)	6,46	0,1547

Nota: pH inicial do meio de 6,50 com adição de tampão.

*Valores da Biomassa em (g).

pH inicial 7,00			pH inicial 7,00		
Tempo (Horas)	pH	Biomassa*	Tempo (Horas)	pH	Biomassa*
1 (1)	5,85	0,1432	8 (1)	5,33	0,1906
1 (2)	5,78	0,1433	8 (2)	5,57	0,1904
2 (1)	5,78	0,1850	9 (1)	5,41	0,1977
2 (2)	5,70	0,1801	9 (2)	5,69	0,1754
3 (1)	5,44	0,1963	10 (1)	5,74	0,1657
3 (2)	5,44	0,1940	10 (2)	5,72	0,2825
5 (1)	5,12	0,1758	15 (1)	5,70	0,2404
5 (2)	5,16	0,1775	15 (2)	5,94	0,1702
6 (1)	5,30	0,2214	36 (1)	6,27	0,0721
6 (2)	5,50	0,1641	36 (2)	6,30	0,0802
7 (1)	5,38	0,1892	48 (1)	6,50	0,0585
7 (2)	5,43	0,1946	48 (2)	6,56	0,0707

*Valores da Biomassa em (g).

ANEXO XIII

Valores obtidos das áreas dos picos cromatográficos de todos os ensaios realizados em meio líquido.

Fermentação em cultura submersa com adição de diferentes açúcares.

Amostras	Área do pico
Sem fonte de carbono (1)	1528926
Sem fonte de carbono (2)	1519954
Sacarose (1)	2609313
Sacarose (2)	2598431
Glicose (1)	2969442
Glicose (2)	2957134
Lactose (1)	3100398
Lactose (2)	3096549

Fermentação em cultura submersa com diferentes concentrações salinas com adição de 1,18 μM de manganês.

Concentração salina (%)	Área do pico
0 (1)	1430709
0 (2)	1431254
2 (1)	1332492
2 (2)	1332198
5,9 (1)	1496187
5,9 (2)	1491125

Fermentação em cultura submersa com diferentes concentrações salinas com adição conjunta de diferentes co-substratos: manganês, ácido ascórbico e α -cetoglutarato.

Concentração salina (%)	Área do pico
0 (1)	1316123
0 (2)	1309899
2 (1)	1267014
2 (2)	1257891
5,9 (1)	1479818
5,9 (2)	1472343

Nota: Foram acrescentados ao meio 50 mg/L de 2,4-D, 1,18 μ M de manganês, 200 μ M de ácido ascórbico e 1 mM de α -cetoglutarato.

Fermentação em cultura submersa com adição dos co-substratos (manganês, ácido ascórbico e α -cetoglutarato) separadamente.

Amostras	Área do pico
α -cetoglutarato (1)	985267
α -cetoglutarato (2)	985458
Apenas 2,4-D (1)	1064032
Apenas 2,4-D (2)	1058791
Manganês (1)	1005102
Manganês (2)	1002012
Ácido ascórbico (1)	1037841
Ácido ascórbico (2)	1027412
Manganês + α -cetoglutarato (1)	1031293
Manganês + α -cetoglutarato (2)	1030935
Ácido ascórbico + α -cetoglutarato (1)	1044389
Ácido ascórbico + α -cetoglutarato (2)	1041467

Nota: Todas as amostras continham 40 mg/L do 2,4-D.

Fermentação em cultura submersa com diferentes pHs do meio de cultura.

pH inicial do meio	Área do pico
5,70 (1)	990939
5,70 (2)	991025
6,50* (1)	971965
6,50* (2)	970164
7,00 (1)	966554
7,00 (2)	966912

Nota: Em todos os ensaios foi adicionado 40 mg/L do 2,4-D e 1mM do α -cetogluturato.

* Foi adicionado ao meio dois reagentes tamponantes no pH 6,50.

